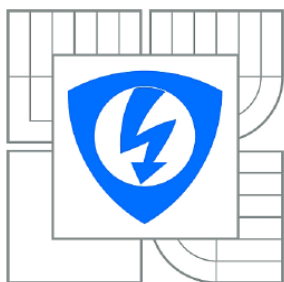




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

ZAŘÍZENÍ PRO MĚŘENÍ KONCENTRACE INTRACELULÁRNÍHO VÁPÍKU V LABVIEW

SYSTEM FOR MEASUREMENT OF CONCENTRATION OF INTRACELLULAR CALCIUM IN
LABVIEW

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

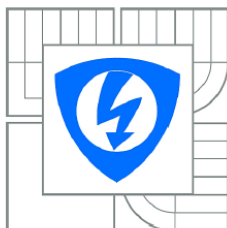
Bc. TIMOTEJ POCHLOPEŇ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. VRATISLAV ČMIEL

BRNO 2014



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor
Biomedicínské a ekologické inženýrství

Student: Bc. Timotej Pochlopeň
Ročník: 2

ID: 115258
Akademický rok: 2013/2014

NÁZEV TÉMATU:

Zařízení pro měření koncentrace intracelulárního vápníku v LabVIEW

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Seznamte se s fluorescenčním a konfokálním mikroskopem a principem měření fluorescence. Seznamte se s fluorescenčními metodami a barvivy pro měření koncentrace intracelulárního vápníku. V dané oblasti vytvořte literární rešerši. 2) Vyberte vhodnou metodu pro měření koncentrace intracelulárního vápníku u živočišných buněk. 3) Navrhněte postup měření dynamiky vápníku excitabilní buňky s pomocí vhodného fluorescenčního barviva. 4) Navrhněte systém pro akvizici, zpracování a vyhodnocení fluorescenčních obrazů. 5) Realizujte navržený systém v programovacím prostředí LabVIEW. Prostředí musí být uživatelsky uzpůsobeno pro výběr ROI, snímání a vyhodnocení obrazů a signálů s okamžitou odezvou. Provedte měření alespoň dvou různých vzorků. 6) Provedte diskusi nad vytvořeným systémem měření, uveďte možnosti a omezení systému.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

- [1] LAKOWICZ, J. R. Principles in Fluorescence Spectroscopy, Plenum Press, New York 1993.
- [2] RELF, G. CH. Image Acquisition and Processing with LabVIEW. CRC Press 2004.

Termín zadání: 10.2.2014

Termín odevzdání: 23.5.2014

Vedoucí práce: Ing. Vratislav Čmiel
Konzultanti diplomové práce:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá osvojením metod pro měření koncentrace intracelulárního vápníku, a takže odpovídajícím zařízením v prostředí LabVIEW. V této práci je představena teorie k principu fluorescence, fluorescenčním metodám a indikátorům pro měření koncentrace intracelulárního vápníku. Jsou navrženy postupy měření pomocí fluorescenčního mikroskopu, kamery a barviva pro měření. Uvedena teorie ke konfokální mikroskopii a jsou porovnány tyto dvě metody. Představeno literární řešení problému. V praktické části je popsán program s grafickým uživatelským rozhraním sloužící k akvizici a analýze dat pro měření dynamiky koncentrace intracelulárního vápníku. V experimentální části je popsána příprava a měření s buňkami a vyhodnocení experimentů.

Klíčová slova

Fluorescence, Fluorescenční mikroskop, Fluorescenční indikátory, Konfokální mikroskop, koncentrace intracelulárního vápníku, mikroskopický obraz, LabVIEW, Modul IMAQ, Modul Vision

Abstract

Master's thesis deals with the methods and system for measurement of concentration of intracellular calcium in LabVIEW. The thesis covers the theory of fluorescence principles, fluorescence methods and indicators for measurement of concentration of intracellular calcium. The procedure of measurement by means of fluorescence microscope, camera and indicators is also mentioned. The theory dealing with confocal microscopy is presented and two techniques are compared. Literary solution is presented. The practical part describes the program with a graphical user interface used for acquisition and analysis of data measuring dynamics of intracellular calcium concentration. The experimental part describes the preparation and measurement of cells and evaluation of experiments.

Keywords

Fluorescence, Fluorescence microscope, Fluorescent indicators, Confocal microscope, Concentration of intracellular calcium, microscopic image, LabVIEW, Module IMAQ, Module Vision

Bibliografická citace:

POCHLOPEŇ, T. Zařízení pro měření koncentrace intracelulárního vápníku v LabVIEW. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2014. 58 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Vratislav Čmiel.

Prohlášení

„Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma Zařízení pro měření koncentrace intracelulárního vápníku v LabVIEW jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.“

Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této diplomové práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne: **23. května 2014**

.....

podpis autora

Poděkování

Děkuji vedoucímu diplomové práce Ing. Vratislavovi Čmielovi za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé diplomové práce.

V Brně dne: **23. května 2014**

.....

podpis autora

Obsah

ZOZNAM OBRÁZKOV	8
1 Úvod.....	10
2 Vápnik v bunkách.....	11
2.1 Tok vápnika v bunkách	11
2.2 Tok vápnika v kardiomyocytoch.....	12
3 Fluorescencia.....	13
4 Fluorescenčný a konfokálny mikroskop.....	15
4.1 Fluorescenčný mikroskop	15
4.2 Konfokálny mikroskop.....	17
4.3 Porovnanie konfokálneho a fluorescenčného mikroskopu.....	18
5 Fluorescenčne indikátory	20
5.1 Vlastnosti fluorescenčných indikátorov	20
5.2 Metódy merania s fluo- indikátormi	22
5.2.1 Meranie intenzity - nepomerové	22
5.2.2 Meranie pomeru v excitácií.....	22
5.2.3 Meranie pomeru v emisií	23
5.3 Porovnanie indikátorov	24
5.3.1 Fura-2	24
5.3.2 Indo-1	24
5.3.3 Fluo-3/Fluo-4	25
5.3.4 Výber indikátora.....	26
6 Postup merania dynamiky Ca^{2+} v bunke	27
6.1 Merací systém	27
6.2 Prístrojové vybavenie.....	27
6.2.1 Fluorescenčný mikroskop a použité filtre	27
6.2.2 Detekčná jednotka.....	29
7 Akvizícia a analýza obrazu v LabVIEW	31
7.1 Návrh metódy.....	31
7.2 Inicializácia a nastavenie detektoru.....	31
7.3 Akvizícia a formátovanie dát	35
7.4 Analýza obrazu	38
7.5 Užívateľské rozhranie	44
8 Experimentálna časť	46

8.1	Izolácia kardiomyocytov	46
8.2	Príprava vzoriek	46
8.3	Elektrostimulácia	47
8.4	Priebeh experimentov.....	47
8.5	Experimenty offline	47
8.6	Vyhodnotenie experimentov	48
8.6.1	Experimenty offline	48
8.6.2	Experimenty so živými bunkami.....	51
8.6.3	Diskusia nad systémom.....	53
8.6.4	Nedostatky programu pre analýzu.....	53
9	Záver.....	55
10	Zoznam použitej literatúry	56
	ZOZNAM SKRATIEK.....	59
	ZOZNAM PRÍLOH	60
	PRÍLOHY	61

ZOZNAM OBRÁZKOV

<i>Obr. 2.1: Mechanizmy podieľajúce sa na kolobehu vápnika [2]</i>	11
<i>Obr. 2.2: Pohyb vápnika v kardiomyocyte [2]</i>	12
Obr. 3.1: Excitácia elektónu a emisia fotónu	13
Obr. 3.2: Stokesov posun [17].....	14
Obr. 4.1: Princíp fluorescenčného mikroskopu [7]	15
Obr. 4.2: Schéma epifluorescenčného mikroskopu.....	16
Obr. 4.3: Fluorescenčná kocka [8]	16
Obr. 4.4: Princíp konfokálneho mikroskopu.....	17
Obr. 4.5: Schéma laserového rastrovacieho konfokálneho mikroskopu	18
Obr. 4.6: Rozlišovacia schopnosť mikroskopov – fluorescenčný (vľavo), konfokálny (vpravo) 19	
Obr. 5.1: Elektromagnetické spektrum [6].....	21
Obr. 5.2: Zvýšenie intenzity emisií pri naviazaní na Ca^{2+} [15].....	22
Obr. 5.3: Posun excitačného spektra pri naviazaní Ca^{2+} [16].....	23
Obr. 5.4: Posun emisného spektra pri naviazaní Ca^{2+} [12]	23
Obr. 5.5: Excitačné spektrá Fura-2 pri emisií 510 nm [16].....	24
Obr. 5.6: Emisné spektrá Indo-1 pri excitácií 388 nm [12].....	25
Obr. 5.7: Emisné spektrá Fluo-3 (červená) a Fluo-4 (modrá) [15]	26
Obr. 6.1: Bloková schéma zariadenia	27
Obr. 6.2: Graf priepustnosti excitačného filtra MF475-35 [20].....	28
Obr. 6.3: Graf priepustnosti dichroického filtra MD498 [20].....	28
Obr. 6.4: Graf priepustnosti emisného filtra MF525-39 [20].....	29
Obr. 6.5: Porovnanie snímku pri rozličnom zosilnení (vľavo 0, vpravo 150)	30
Obr. 6.6: Citlivostné spektrum kamery Ixon3 860 [18]	30
Obr. 7.1: Bloková schéma programu	31
Obr. 7.2: Bloková schéma inicializácie kamerového systému.....	32
Obr. 7.3: Funkcia inicializácie	32
Obr. 7.4: Funkcia zisťujúca rozmery detektoru	32
Obr. 7.5: Funkcia nastavujúca mód uzávierky.....	33
Obr. 7.6: Funkcia nastavujúca mód akvizície	33
Obr. 7.7: Funkcia nastavujúca rozloženie výstupných dát.....	33
Obr. 7.8: Funkcia nastavujúca veľkosť výstupných dát.....	34
Obr. 7.9: Alokácia pamäte	34
Obr. 7.10: Vývojový diagram akvizície a formátovanie dát.....	35

Obr. 7.11: Funkcia nastavenia zosilnenia čipu.....	36
Obr. 7.12: Funkcia nastavenia času expozície	36
Obr. 7.13: Funkcia spúšťajúca akvizíciu.....	36
Obr. 7.14: Zber a konverzia dát na typ Image.....	37
Obr. 7.15: Funkcia ukončenia akvizície (vľavo) a ukončenia programu (vpravo)	38
Obr. 7.16: Bloková schéma pre analýzu obrazu.....	38
Obr. 7.17: Výber ROI	39
Obr. 7.18: Celková intenzita ROI	40
Obr. 7.19: FIR filter typu pásmová priepusť.....	41
Obr. 7.20: Detekcia a vyznačenie peakov	42
Obr. 7.21: Výpočet frekvencie oscilácií.....	42
Obr. 7.22: Meranie amplitúdy oscilácií.....	43
Obr. 7.23: Priemerná intenzita riadkov/stĺpcov	43
Obr. 7.24: Profil intenzity vektoru	44
Obr. 8.1: Porovnanie filtrov s rôznymi váhovacími oknami.....	49
Obr. 8.2: Časový priebeh zmeny frekvencie oscilácií.....	50
Obr. 8.3: Posun izolínie.....	50
Obr. 8.4: Porovnanie snímkov so zosilnením (vpravo) a bez (vľavo)	51
Obr. 8.5: Sekvencie záznamu vápnikových vĺn	52

1 ÚVOD

Medzi vlastnosti všetkých živých buniek patrí ich schopnosť reagovať na rôzne vonkajšie podnety. Tieto vonkajšie podnety (signály) sú zachytávané receptormi na povrchu bunky a prenášané rôznymi mechanizmami cez bunečnú membránu do vnútra bunky.

Vápenný kation Ca^{2+} má kľúčovú úlohu čo sa týka fyziológie a biochémie organizmov a samotnej bunky. Tento kation či už vo väčšej alebo menšej miere riadi početné funkcie (regulačné mechanizmy) v každom type buniek napr.: depolarizáciu plazmatickej membrány či hormonálna aktivácia živočíšnych buniek. Všetky tieto regulačné mechanizmy majú akýsi hlavný ukazovateľ a tým je intracelulárny vápnik. Voľný intracelulárny vápnik sa nachádza v bunkách vo veľmi malom množstve, ktoré je udržiavané radou mechanizmov na úrovni 10^{-7} - 10^{-9} mol/l, preto aj drobná zmena v jeho koncentrácii dokáže vyvolať následné rýchle a veľké zmeny jeho koncentrácie. Práve preto je veľmi dôležitou častou biologického výskumu meranie dynamiky koncentrácie intracelulárneho vápnika.

Koncentrácia môže byť meraná rôznymi metódami ako elektrochemickou metódou, rádiometrickou metódou a metódami bioluminiscenčných indikátorov, fluorescenčných indikátorov a fluorescenčných proteínov a inými. Týmito metódami je možné skúmať mechanizmy, ktoré majú za následok zmenu koncentrácie vápenných kationov v živých bunkách (in vivo), v izolovaných bunkách či v bunkách, ktoré sú súčasťou tkanív či pletív alebo (in vitro) v izolovaných a rekonštituovaných membránových včkoch. Hlavné zásady merania intracelulárneho vápnika sú minimálna invazivita metódy a možnosť merať dynamiku koncentrácie vápnika aj v jednotlivých bunečných kompartmentoch oddelene a následne určiť ich vzájomné vzťahy.

Cieľom práce je návrh vhodnej metódy merania dynamiky koncentrácie vápnika u živočíšnych buniek, návrh systému pre akvizíciu, spracovanie a vyhodnotenie získaných dát. Tento systém bude realizovaný v programovacom prostredí LabVIEW.[4]

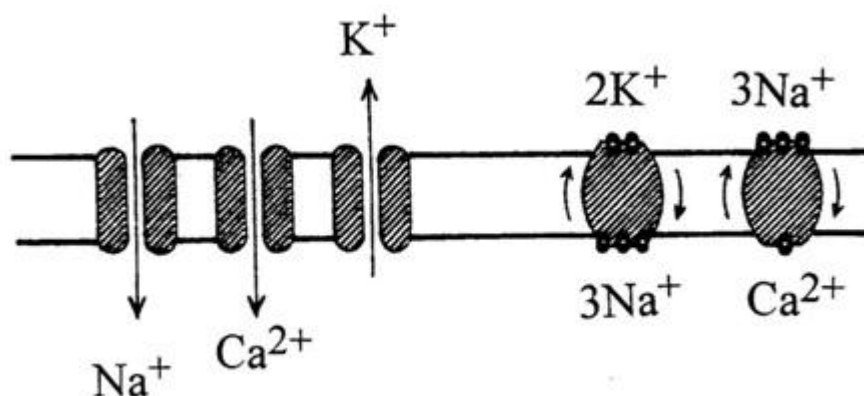
2 VÁPNIK V BUNKÁCH

2.1 Tok vápnika v bunkách

Ióny vápnika zohrávajú významnú úlohu vo vnútrobunkovej signalizácii. Podieľajú sa na regulácii najrôznejších fyziologických dejov, ako je tvorba bielkovín, vývoj bunky, prenos signálov medzi nervovými bunkami alebo kontrakcia svalových buniek. Preto je z dôvodu pochopenia najrôznejších fyziologických procesov venovaná vápniku veľká pozornosť.

Hlavnými nosičmi signálov v bunkách sú ióny obsiahnuté v intra- a extracelulárnom prostredí. Sú to hlavne Ca^{2+} , Na^+ , K^+ a Cl^- . Je zistené že extracelulárna koncentrácia vápnika je omnoho väčšia ako jeho koncentrácia vo vnútri bunky (môže dosahovať až 100 000 násobok). Tento chemický gradient a fakt, že vnútorné prostredie bunky je elektricky záporné oproti vonkajšiemu prostrediu majú za následok snahu vápenných katiónov dostať sa do bunky. Vápnikové kanály, ktoré sa nachádzajú v bunečnej membráne (nepriepustnej pre ióny) sú však za normálnych membránových potenciálov nepriepustné. Pri znížení membránového potenciálu sa však spolu so sodíkovými a draselnými kanálmi otvárajú. Z intracelulárneho priestoru je vápnik odčerpávaný tromi spôsobmi.

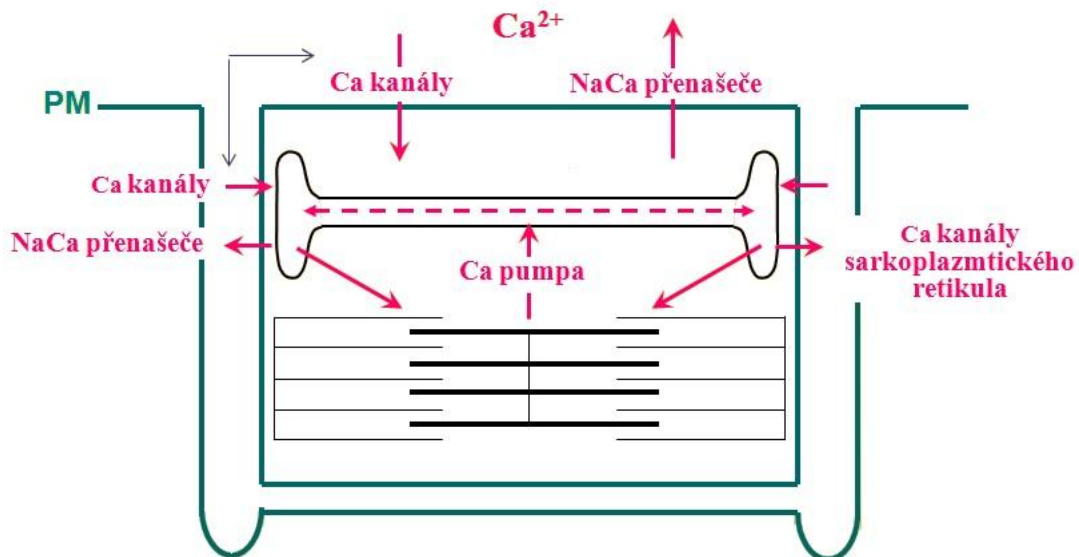
Prvým je vápniková pumpa, ktorá získava energiu potrebnú pre jeho vypudenie spaľovaním kyseliny adenotrifosforečnej (ATP). Druhým mechanizmom je Na-Ca výmenný systém, ktorý parazituje na Na-K pumpe a využíva energiu sodíkového gradientu k vypudeniu iných iónov z bunky. Tretím je iný druh vápnikovej pumpy, ktorý ukladá vápnik do bunečných skladov.[1], [2], [3]



Obr. 2.1: Mechanizmy podieľajúce sa na kolobehu vápnika [2]

2.2 Tok vápnika v kardiomyocytoch

Kardiomyocyty sú základnou jednotkou srdečnej svaloviny. Kardiomyocyt je excitabilná bunka vyplnená kontraktilným aparátom, ktorý je tvorený myofibrilami dvoch typov. Jedným typom sú tenké aktínové filameny, do ktorých sa zasúvajú hrubšie myosinové filameny. Kontrakcia je spustená impulzom akčného potenciálu, avšak nositeľom signálu v bunke sú vápenné katióny Ca^{2+} . Po príchode akčného potenciálu stúpne koncentrácia Ca^{2+} v intracelulárnom priestore, čím sa aktivujú vypudzovacie mechanizmy na membráne sarkoplazmatického retikula a vypudia do intracelulárneho priestoru ďalšie Ca^{2+} čím sa opäť zvýši koncentrácia. Ca^{2+} sa naviaže v kontraktilnom aparáte a vznikne tak priečny most medzi aktínom a myosinom, a tým kontrakcia. Aby nedošlo k trvalej kontrakcii, je vápnik opäť odčerpávaný do sarkoplazmatického retikula za štiepenia ATP.[2]



Obr. 2.2: Pohyb vápnika v kardiomyocyte [2]

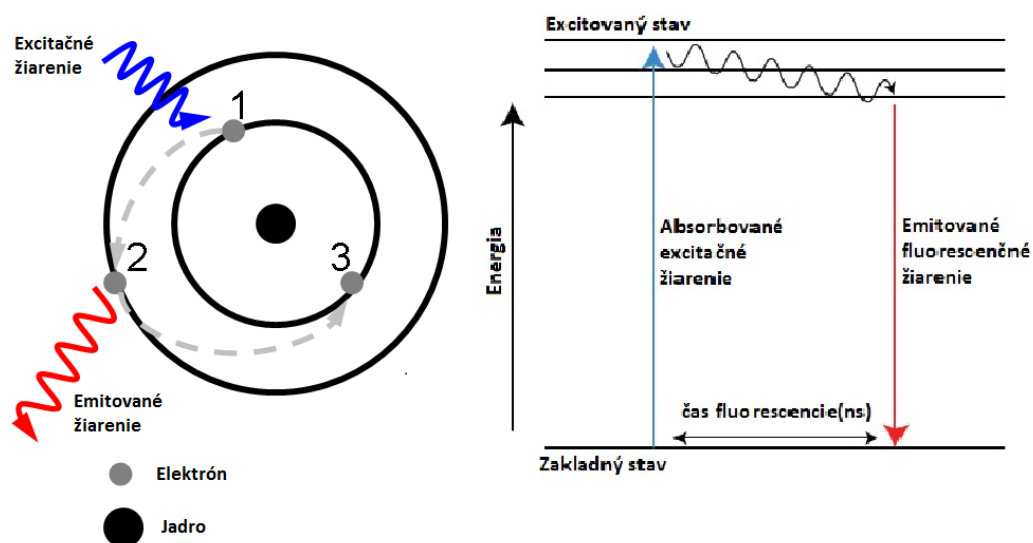
Pri pozorovaní dynamiky koncentrácie intracelulárneho vápnika v kardiomyocyte sú pozorované oscilácie v rádoch sekúnd. Tieto oscilácie sa vyskytujú vo formách transientu a vo forme vlny. Transient sa prejavuje ako rýchly nárast koncentrácie intracelulárneho vápnika v celom priestore bunky. Šírenie vápnikových vln je spôsobené difúziou vápnika medzi Ca^{2+} vypudzovacie mechanizmy. Vápnik vypudený týmto mechanizmom sa šíri postupne k ďalším a tým spustí ďalšie vypudzovanie. Ide o vápnikom indukované uvoľňovanie vápnika. Opakovaním tohto procesu sa generuje postupná zvýšená koncentrácia vápnikových iónov, čo je pozorované ako vápniková vlna.

3 FLUORESCENCIA

Fluorescencia je fyzikálno-chemický dej, ktorý je typom luminiscencie (fotoluminiscencie). Luminiscencia je dej, ktorý nastáva pokiaľ vlastné žiarenie telesa výrazne prevažuje nad jeho tepelným žiarením a trvá dlhšie ako perióda tohto žiarenia. Luminiscencia nastáva pri interakcii atómu s určitým dopadajúcim elektromagnetickým žiarením (excitačným žiarením), následkom čoho začne atóm sám žiarenie vysielat'. Toto vysielané žiarenie nazývame fluorescenčným (emisným žiarením). Toto elektromagnetické žiarenie je tok fotónov nesúcich energiu. Fotóny primárneho (excitačného) žiarenia môžu byť látkou absorbované alebo v nej byť rozptýlené, pričom sú dva typy rozptylov - Comptonov a Raylieghov.

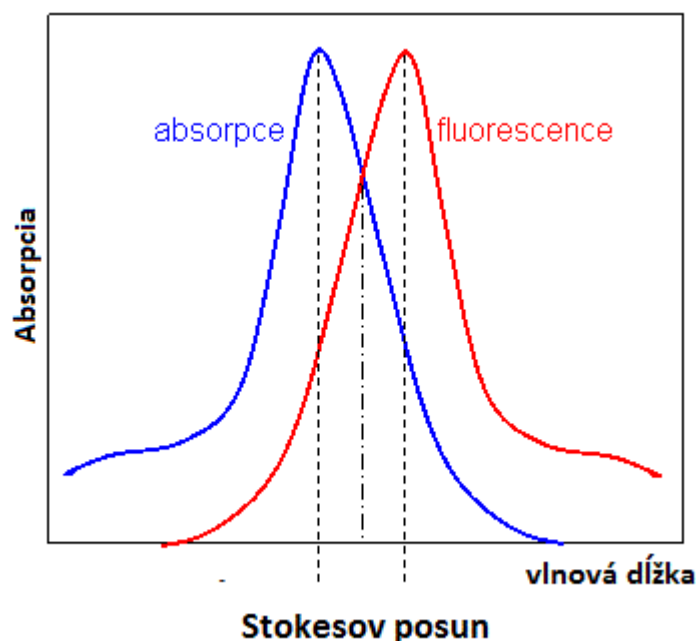
Najpravdepodobnejšou možnosťou interakcie žiarenia s látkou je absorpcia žiarenia. Fotón odovzdá celú svoju energiu elektrónu. Fotón pri tejto interakcii zaniká. Pokiaľ prijal elektrón dostatočne veľkú energiu dochádza k ionizácii a elektrón vyletí von z atómu. Tento jav sa nazýva fotoelektrický jav.

Elektróny sú v atóme rozložené na energetických hladinách a atóm sa snaží zaujať základný stav s najnižšou možnou energiou. Ak elektrón absorpciou žiarenia neprijme dostatočnú energiu aby opustil atóm, elektróny z nižších vrstiev sa vybudia do energeticky vyšších vrstiev. Atóm, ktorý má aspoň jeden elektrón na vyššej vrstve ako je jeho základný stav sa nazýva excitovaný. Tento atóm má prirodzene snahu o návrat excitovaného elektrónu alebo elektrónov na ich základnú hladinu. Pri návrate elektrónu späť z vyššej vrstvy na nižšiu sa rozdiel týchto dvoch energií vyžiarí vo forme fotónu.[6], [9], [11]



Obr. 3.1: Excitácia elektrónu a emisia fotónu

Z tohto javu vyplývajúci sekundárny tok fotónov nazývaný emisné žiarenie, sa vyznačuje dlhšou vlnovou dĺžkou ako excitačné žiarenie. Tento jav sa nazýva Stokesov posun podľa svojho objaviteľa britského vedca Sira Georga G. Stokesa, ktorý v polovici devätnásteho storočia ako prvý pozoroval jav fluorescence pri ožarovaní fluoritu ultrafialovým svetlom.[17]



Obr. 3.2: Stokesov posun [17]

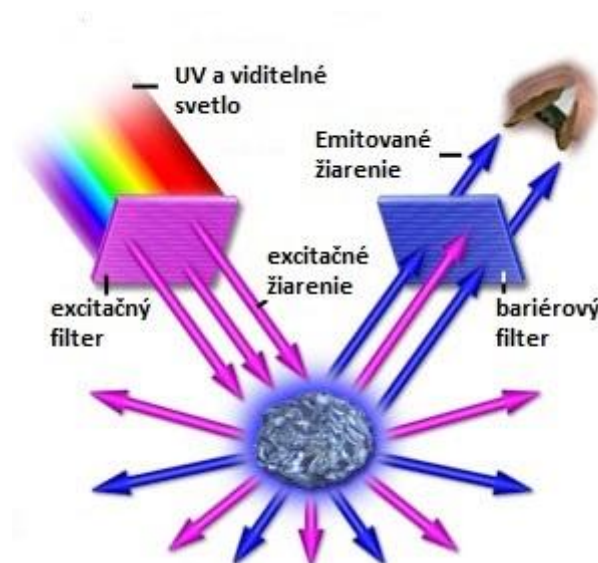
Fluorescencia ako jeden z typov fotoluminiscencie sa vyznačuje veľmi krátkym časom vyžarovania energie rádovo 10^{-9} - 10^{-6} s. Ďalším typom fotoluminiscencie je fosforescencia, pri ktorej emisia žiarenia z excitovaného elektrónového stavu uplatňuje metastabilnú hladinu. Z dôvodu uplatnenia metastabilného stavu je doba dohasínania u fosforescencie oveľa dlhšia ako u fluorescence ($\gg 10^{-6}$).

Najširšie využitie fluorescence v bunečnej biológii a molekulárnej genetike je špecifické označovanie molekúl v tkanivách (proteíny, lipidy, sacharidy), zviditeľnenie niektorých bunečných štruktúr (jadrá, cytoskelet) a označenie určitých sekvencií v DNA či RNA.[17]

4 FLUORESCENČNÝ A KONFOKÁLNY MIKROSKOP

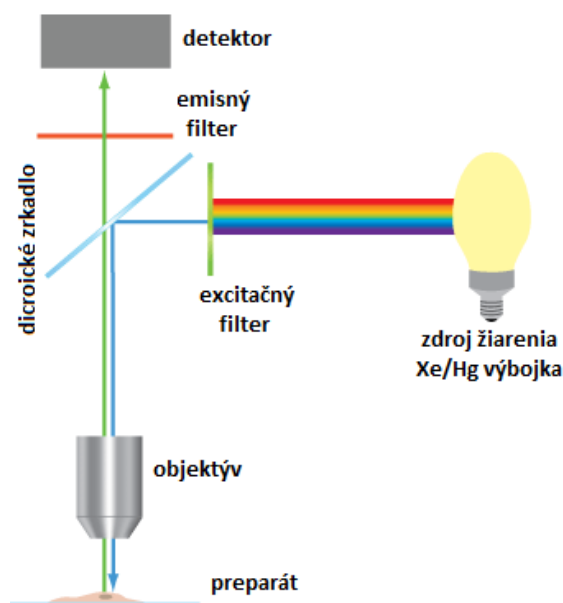
Mikroskopy sú dôležitým nástrojom výskumu biológie a fyziológie mikroorganizmov a ich bunečných častí.

4.1 Fluorescenčný mikroskop



Obr. 4.1: Princíp fluorescenčného mikroskopu [7]

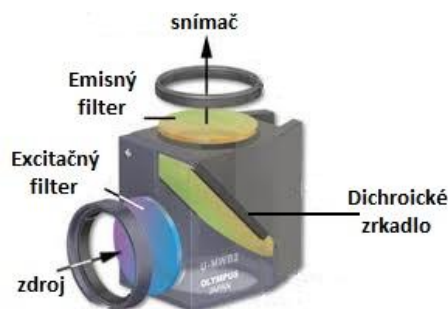
Fluorescenčný mikroskop je veľmi podobný a môže byť používaný ako klasický optický mikroskop. To, čo ho odlišuje od klasického mikroskopu je ďalší zdroj svetla a tzv. fluorescenčná kocka. Druhým zdrojom svetla je xenónová alebo ortuťová výbojka, z dôvodu generácie širokého spektra elektromagnetického žiarenia. Toto spektrum zahŕňa viditeľnú časť spektra ako aj ultrafialovú časť spektra pre potreby excitácie preparátu.[7]



Obr. 4.2: Schéma epifluorescenčného mikroskopu

Fluorescenčná kocka sa skladá z dvoch filtrov a dichroického zrkadla. Dichroické zrkadlo je taktiež druh filtru, ktorý do určitej vlnovej dĺžky žiarenie odráža a dlhšie vlnové dĺžky prepúšťa. Od zdroja sa šíri žiarenie so širokým spektrom cez prvý filter nazývaný excitačný, ktorým sa vyberá požadovaná vlnová dĺžka excitačného žiarenia. Následne je toto žiarenie odrazené dichroickým zrkadlom na skúmaný preparát. Po ožiarení preparátu dochádza k odrazu excitačného žiarenia od preparátu a emisií žiarenia preparátom. Toto žiarenie môže obsahovať aj zložky spektra, ktoré môžu ovplyvňovať meranie a prechádzajú vďaka dlhšej vlnovej dĺžke cez dichroické zrkadlo. Emisný filter, tiež nazývaný barierový, má za úlohu vyfiltrovať zo spektra emisného žiarenia požadovanú vlnovú dĺžku, ktorá následne prechádza optikou do očí alebo je snímaná detektorom, najčastejšie v podobe snímača CCD.

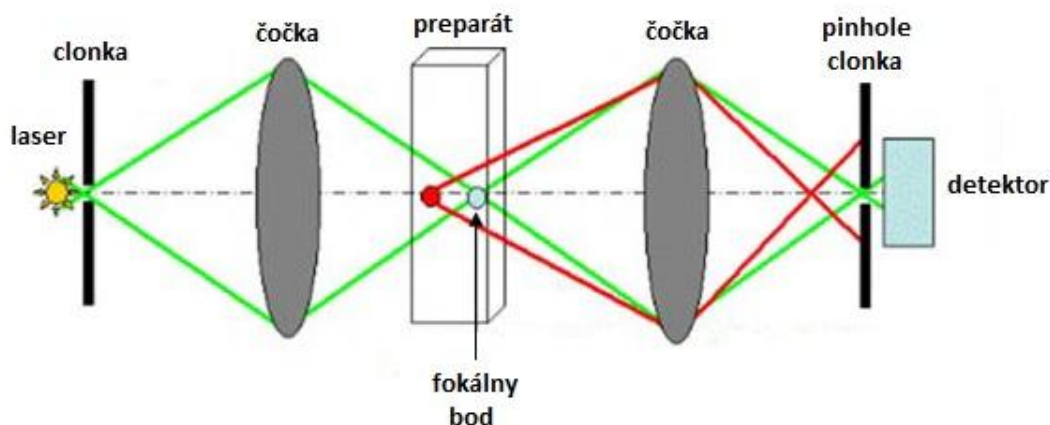
Fluorescenčný mikroskop sa používa na pozorovanie rýchlych bunecných procesov. Deteguje však svetelný signál z celého preparátu, teda aj časti signálu mimo rovinu ostrosti.[7], [8]



Obr. 4.3: Fluorescenčná kocka [8]

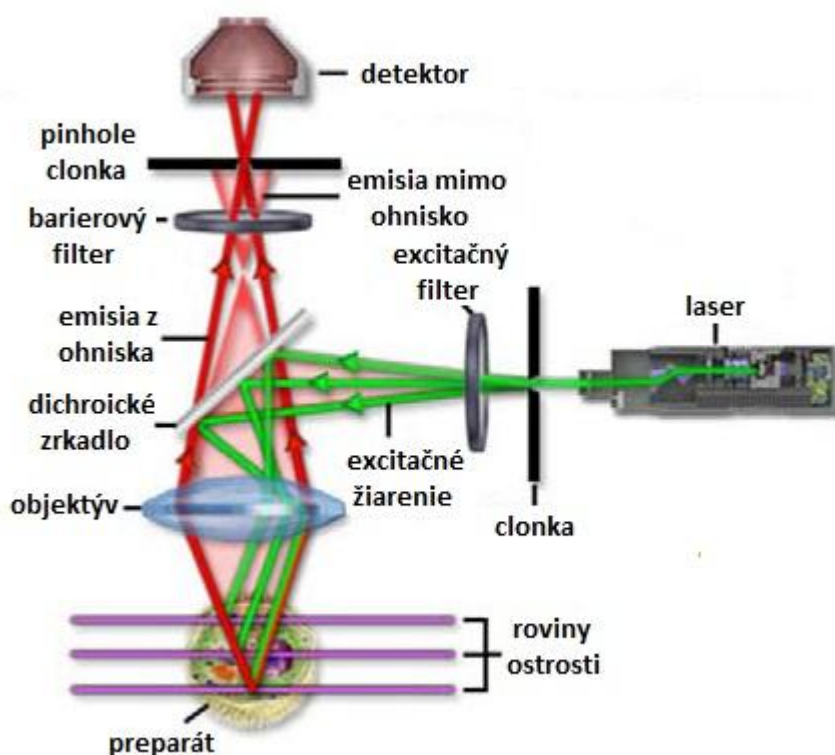
4.2 Konfokálny mikroskop

Konfokálny mikroskop je špeciálny mikroskop, ktorý disponuje vysokou rozlišovacou schopnosťou, ovládaním hĺbky ostrosti a je schopný eliminovať rozostrené prvky obrazu získavané mimo roviny ostrosti. Mikroskop je rastrovací a zdrojom elektromagnetického žiarenia je spravidla výkonný laser. Mikroskop zaostruje na určitú rovinu preparátu a „rastrovací“ znamená, že preparát je v tejto rovine osvecovaný z laserového zdroja bod po bode. Žiarenie emitované z tohto bodu musí prejsť bodovou clonkou tzv. „pinhole“, ktorá je konjugovaná s fokálnym bodom optiky. Signál emitovaný mimo fokálny bod je následne fokusovaný mimo pinhole a teda nemôže prejsť na detektor a byť detegovaný. V prípade väčšieho pinhole je získavaný signál aj mimo fokálny bod a naopak v prípade menšieho pinhole sa stráca užitočný signál. Týmto spôsobom je získaný signál z jedného bodu.



Obr. 4.4: Princíp konfokálneho mikroskopu

Koherentné žiarenie emitované z laserového systému prechádza clonkou, ktorá je konjugovaná so skenovaným bodom v rovine ostrosti a druhou clonkou umiestnenou pred detektorom (fotonásobičom). Žiarenie dopadá na excitačný filter, ktorým prejde iba potrebná časť spektra a odráža sa od dichroického zrkadla. Odrazené žiarenie prechádza objektívom a skenuje preparát v definovanej rovine ostrosti. Emisné fluorescenčné žiarenie z excitovaného bodu preparátu prechádza objektívom aj dichroickým zrkadlom a dopadá na emisný filter, ktorý neprepustí časti spektra, ktoré by mohli ovplyvniť meranie, či byť nepriaznivé pre človeka (UV). Následne žiarenie dopadá na pinhole clonku, ktorou neprejde žiarenie emitované mimo konjugovaného bodu ohniska. Získavanie signálu skenovaním bod po bode a z iných optických rovín je automatizované a riadené počítačom, ktorý zo získaných dát zostrojí výsledný obraz.



Obr. 4.5: Schéma laserového rastrovacieho konfokálneho mikroskopu

4.3 Porovnanie konfokálneho a fluorescenčného mikroskopu

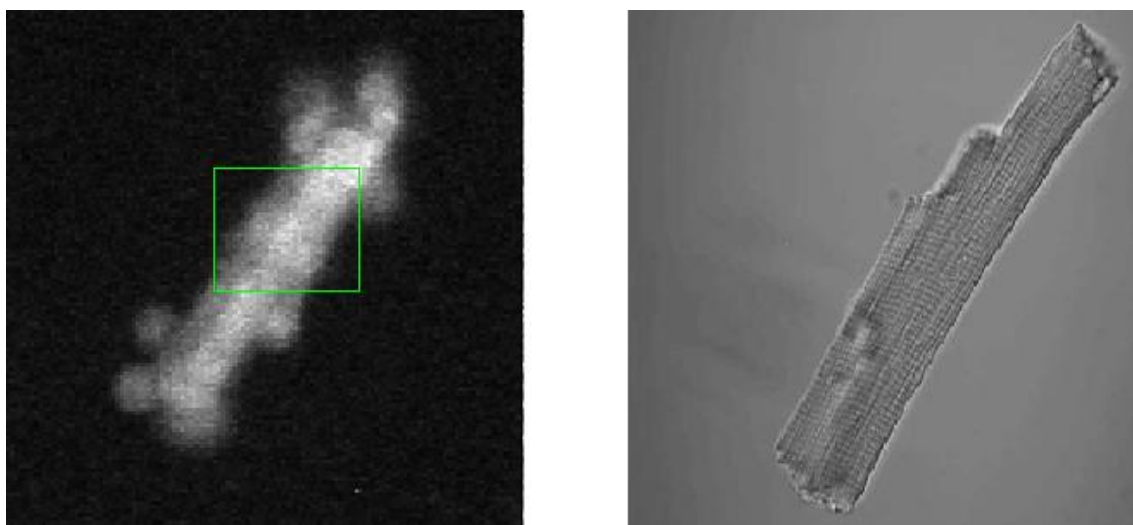
Konfokálny mikroskop disponuje vyššou rozlišovacou schopnosťou než fluorescenčný (porovnanie rozlišovacej schopnosti na obr. 4.6), ktorá je daná detekciou žiarenia iba z roviny ostrosti mikroskopu. Neostrý signál vo vertikálnej, ako aj v horizontálnej polohe je potlačený použitím pinhole clonky, čím je dosiahnutá minimálna hĺbka ostrosti. Skladaním jednotlivých bodov je možná 3D rekonštrukcia obrazu.

Na druhej strane je cena prístroja, ktorá môže byť 5x-10x vyššia ako pri fluorescenčnom mikroskope z dôvodu potreby špeciálnej technológie detekcie fotónov z horizontálnej roviny a mimoriadne silného zdroja žiarenia typu laser. S laserom ako so zdrojom vysokého výkonu je spojená aj možnosť vysvietenia preparátu- fotobleaching alebo poškodenia bunky.

Fluorescenčný mikroskop využíva ako zdroj žiarenia ortuťové alebo xenónové výbojky, čo výrazne znižuje jeho cenu oproti konfokálnemu. Tento zdroj žiarenia disponuje menším výkonom, preto sa v oveľa menšej miere prejavuje fotobleaching. U fluorescenčného mikroskopu je obraz získavaný z celého preparátu a nie jeho skenovaním, tým sa výrazne skraca čas potrebný na snímanie obrazu a je možné zaznamenať aj rýchle zmeny v preparáte.

So získavaním obrazu z celého preparátu je spojená nevýhoda snímania signálu aj mimo rovinu ostrosti, pretože v reálnom prípade nie je možné predpokladať nekonečne malú hrúbku preparátu. Snímaním týchto signálov dochádza k prekryvaniu roviny ostrosti s nezaostrenými obrazmi rovín nad a pod touto rovinou.

Táto práca pojednáva o meraní dynamiky koncentrácie intracelulárneho vápnika. Tieto experimenty sú krátke, zmeny v koncentrácií sú pomerne rýchle a je potrebné získavať informácie z celej oblasti záujmu v reálnom čase. Pre aplikáciu tohto typu merania nie je potrebná vysoká rozlišovacia schopnosť. Z toho dôvodu je výhodnejšie použitie fluorescenčného mikroskopu.



***Obr. 4.6: Rozlišovacia schopnosť mikroskopov – fluorescenčný (vľavo),
konfokálny (vpravo)***

5 FLUORESCENČNE INDIKÁTORY

Fluorofory sú látky, ktoré sú schopné fluorescencie, teda absorbovať žiarenie určitej vlnovej dĺžky a následne emitovať žiarenie o dlhšej vlnovej dĺžke. Delia sa na vlastné a nevlastné. Ako vyplýva z názvu, vlastné fluorofory sú schopné vlastnej fluorescencie a častejšie používané nevlastné sú pridávané k preparátom, aby sa naviazali na látku, ktorá nie je bez nevlastného fluoroforu schopná emitovať žiarenie.

Nevlastné fluorofory sa následne delia podľa typu väzby k preparátu. Kovalentnou väzbou sa viažu fluorescenčné značky a nekovalentnou fluorescenčné sondy a indikátory.

Medzi fluorescenčné indikátory radíme tiež fluorofory, ktoré vykazujú zmenu intenzity alebo spektra fluorescencie v prítomnosti danej látky. Táto práca pojednáva o meraní dynamiky koncentrácie intracelulárneho vápnika, a preto je vhodné použiť fluorescenčné indikátory, ktoré vykazujú zmeny v prítomnosti danej látky - vápnikových iónov Ca^{2+} .

5.1 Vlastnosti fluorescenčných indikátorov

Fluorescenčné indikátory sa dnes v širokej miere používajú hlavne pri mikroskopickom pozorovaní zmien koncentrácie vápenných kationov Ca^{2+} in vivo. Samozrejme, že sú použiteľné aj pri metódach in vitro. V porovnaní s inými metódami merania koncentrácie vápnika ponúkajú fluorescenčné indikátory menší dynamický rozsah, avšak ich hlavnou výhodou sú veľmi krátke reakčné časy. Dnes je známych viac ako 100 rôznych indikátorov pre vápenný kation Ca^{2+} , ktoré sú excitované ultrafialovým alebo viditeľným svetlom.

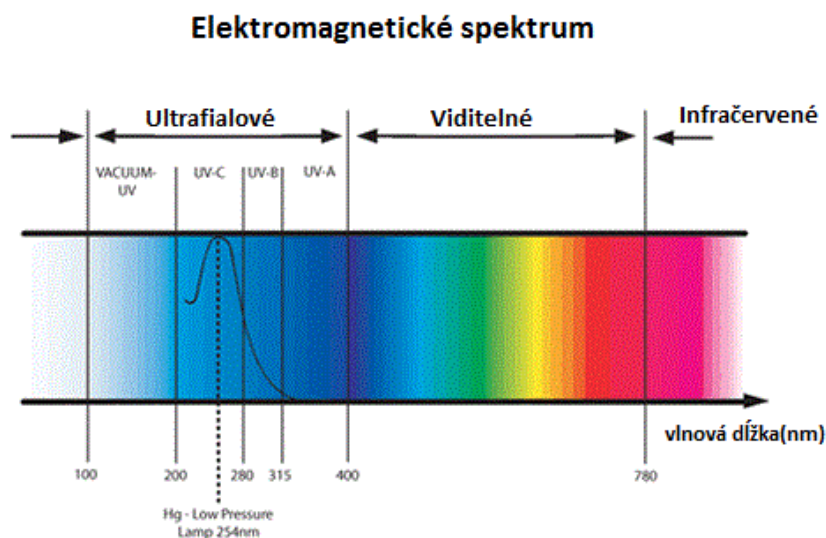
Fluorescenčné indikátory delíme do viacerých skupín. Jedno z delení je na pomerové a nepomerové indikátory.

Pomerové indikátory posúvajú polohu svojho excitačného alebo emisného maxima po naviazaní na vápenný kation Ca^{2+} . Sledovaný pomer intenzít fluorescencie u voľnej formy indikátoru a u indikátoru naviazaného na vápenný kation Ca^{2+} v ich excitačných alebo emisných maximách je závislý na koncentrácií voľných Ca^{2+} a nie je závislý na koncentrácií indikátoru v meranom roztoku.

Nepomerovým indikátorom chýba vlastnosť posunu excitačného alebo emisného maxima, a preto je nutné pre výpočet koncentrácie Ca^{2+} poznať aktuálnu koncentráciu indikátoru v meranom roztoku.[4]

Ďalším aspektom, podľa ktorého sa delia fluorescenčné indikátory je rozdelenie podľa absorpčného spektra indikátora. Pre zvolený indikátor môže byť excitačné

žiarenie v ultrafialovej oblasti spektra (100-400nm) alebo vo viditeľnej oblasti spektra (400-780nm). Preto je dôležité, aby boli excitačné a emisné spektrá indikátoru v rozsahu vlnových dĺžok meracieho systému. Pre potrebu analyzovať viacero rôznych parametrov je populárna metóda vpravovania viacerých indikátorov súčasne do meraného vzorku. Aby sme rozlíšili tieto indikátory od seba je nutné, aby mal každý z nich iné emisné spektrum.



Obr. 5.1: Elektromagnetické spektrum [6]

Ďalším aspektom pri výbere indikátoru je jeho chemická forma. Formy indikátorov môžu byť rôzne - soli, estery, dextrán konjugátov,... Chemická forma ukazovateľa je dôležitá z hľadiska zavedenia indikátora do samotnej bunky invazívnym alebo biochemickým postupom. Mnohé z fluorescenčných indikátorov Ca^{2+} sú naviazané na svoj príslušný acetoxymethylester. Indikátor v takejto forme môže pasívne difundovať cez bunkové membrány a v momente, keď sa dostane do vnútra bunky esterázy odštiepi skupinu acetoxymethylesteru a tým „uväzní“ vytvorený voľný anión v cytoplazme. Indikátor vo forme esteru však môže byť v bunke vytesňovaný do určitých organel a niektoré bunky takéto indikátory rýchlo vylučujú alebo ich neakumulujú. Pre väčšie bunky boli vyvinuté formy konjugované s dextrátom, ktoré však musia byť do bunky vpravené mikroinjektovaním alebo mikropipetou. Existujú tiež metódy, ktoré boli vyvinuté za účelom vpravenia indikátoru do veľkého počtu buniek v tkanive alebo orgáne.

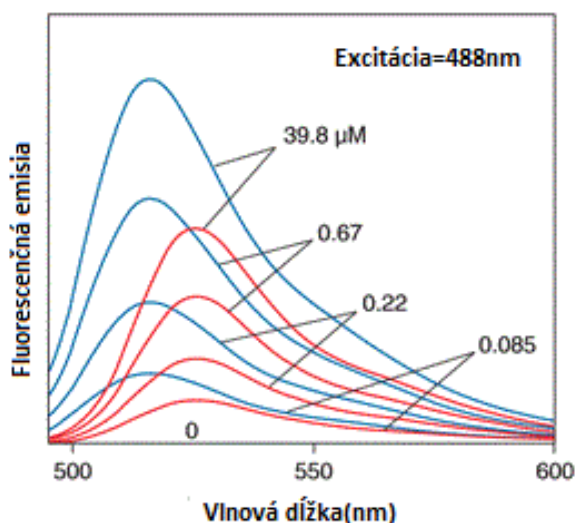
Jedna z najdôležitejších vlastností fluorescenčného indikátora je väzbová afinita, čo je schopnosť zlúčeniny reagovať s iným atómom alebo zlúčeninou. Pri vysokej afinite sa indikátor rýchlo nasýti pri relatívne nízkej koncentrácii Ca^{2+} čo môže mať za následok chybu merania. Veľmi používanými sú však indikátory s nízkou afinitou, ktoré

je možné využiť pri meraní koncentrácie Ca^{2+} v subcelulárnych organelách, z ktorých napr. sarkoplazmatické retikulum a endoplazmatické retikulum obsahujú vysokú hladinu Ca^{2+} a preto by bolo náročné ju merať s indikátorom s vysokou afinitou. Indikátory s nízkou afinitou sú tiež používané pri meraní rýchlych zmien, pretože kinetika reakcie je dostatočne rýchla, aby boli zmeny koncentrácie Ca^{2+} merané s vysokým časovým rozlíšením.[5]

5.2 Metódy merania s fluo- indikátormi

5.2.1 Meranie intenzity - nepomerové

Pri meraní intenzity fluorescence je preparát excitovaný svetlom o jednej vlnovej dĺžke. Zmenu intenzity emisie meriame a analyzujeme taktiež na jednej vlnovej dĺžke v závislosti na koncentracii Ca^{2+} v priestore. Táto metóda je závislá na koncentracii indikátora v skúmanom preparáte, čo sa dá považovať za nevýhodu. Na druhej strane patrí k rýchlym a jednoduchým metódam merania koncentrácie Ca^{2+} . Pre túto metódu sa používajú napríklad indikátory Rhod-2, Fluo-3 a Fluo-4.[4], [10]

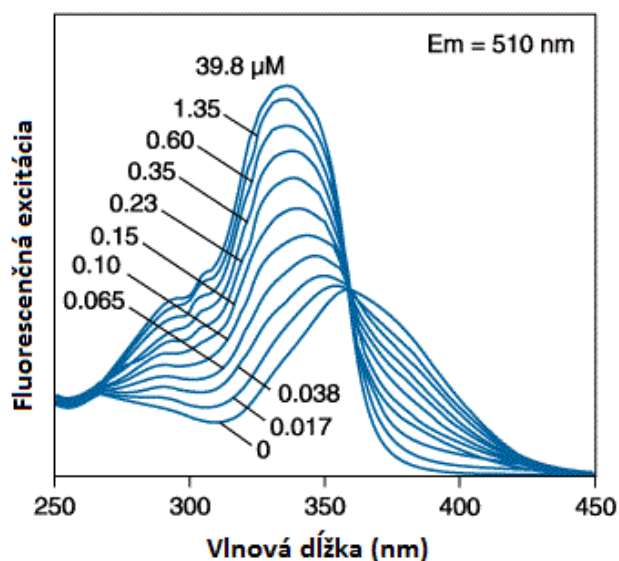


Obr. 5.2: Zvýšenie intenzity emisií pri naviazaní na Ca^{2+} [15]

5.2.2 Meranie pomeru v excitácii

Pri meraní pomeru v excitácii využívame fakt že určité indikátory pri neviazaní na Ca^{2+} vyžarujú emisie pri excitácii určitou vlnovou dĺžkou a po naviazaní na Ca^{2+} vyžarujú emisie s veľmi blízkym spektrom predchádzajúcemu, avšak je nutné excitovať preparát inou vlnovou dĺžkou. Táto excitácia dvoma rôznymi vlnovými dĺžkami sa vykonáva zmenou excitačných filtrov umiestnených medzi zdrojom žiarenia

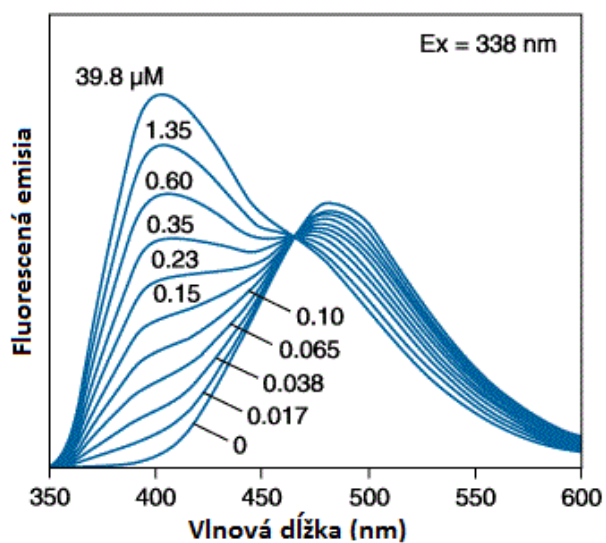
a preparátom. Vyhodnocujeme pomer excitačných spektier. Táto metóda nie je závislá na koncentrácií indikátora v preparáte.[4], [10]



Obr. 5.3: Posun excitačného spektra pri naviazaní Ca^{2+} [16]

5.2.3 Meranie pomeru v emisií

U metódy merania pomeru v emisií je využitý podobný princíp ako v predchádzajúcej metóde, avšak s tým rozdielom, že sú použité indikátory, ktoré po naviazaní Ca^{2+} posúvajú spektrum emisného žiarenia pri nezmenenom excitačnom spektre. Pre meranie dvoch rôznych emisných spektier je potrebná zmena emisných (bariérových) filtrov. Vyhodnocuje sa pomer emisných spektier. Metóda nie je závislá na koncentrácií indikátora v preparáte.[4], [10]

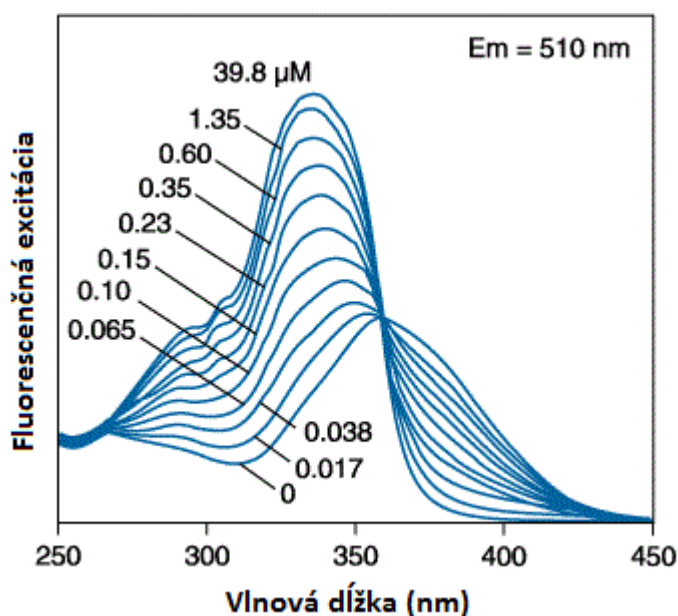


Obr. 5.4: Posun emisného spektra pri naviazaní Ca^{2+} [12]

5.3 Porovnanie indikátorov

5.3.1 Fura-2

Meranie touto metódou výrazne znižuje účinky úniku farbiva, nerovnomerného farbenia, ako aj problémy spojené s meraním Ca^{2+} v bunkách s rôznou hrúbkou. Meranie s Fura-2 môže trvať po dobu jednej hodiny bez toho, aby došlo k výraznej strate fluorescencie. Pri nízkych koncentráciách indikátora je pomerová excitácia 340/380 nm a analyzujú sa emisie na vlnovej dĺžke cca 510 nm. Pri voľnom Ca^{2+} je vrchol excitačného spektra na hodnote 380 nm pri vrchole emisného spektra na 510 nm. Po naviazaní Ca^{2+} sa posúva vrchol excitačného spektra k hodnote 340 nm, taktiež pre vrchol emisného spektra 510 nm a zvyšuje sa jeho excitačná účinnosť, čo má za následok zvýšenie fluorescenčných emisií. Je nutné ožarovať preparát dvomi vlnovými dĺžkami.[5], [14]

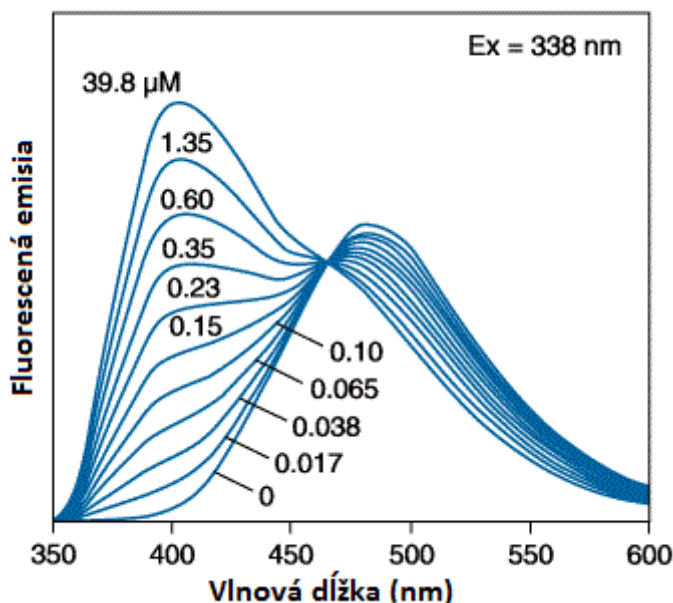


Obr. 5.5: Excitačné spektrá Fura-2 pri emisií 510 nm [16]

5.3.2 Indo-1

Pri nízkych koncentráciách indikátora sú využité vlnové dĺžky emisií 405/485 nm, čo umožňuje presné meranie intracelulárnej koncentrácie Ca^{2+} . Meranie pomerovou analýzou výrazne znižuje účinky nerovnomernosti farbiva, úniku farbiva, rovnako ako problémy spojené s meraním Ca^{2+} v bunkách, ktoré nemajú rovnakú hrúbku. Meranie indo-1 fluorescencie môže byť obvykle vykonávané po dobu jednej hodiny bez toho, aby došlo k výraznej strate fluorescencie, či už únikom indikátora alebo bielením.

Oproti Fura indikátorom, ktoré vykazujú výrazné zmeny v absorpcii po naviazaní na Ca^{2+} , sú u indikátora indo-1 výrazné posuny emisií, ktoré sa pohybujú od cca 475 nm pre voľné Ca^{2+} do cca 400 nm pre naviazané Ca^{2+} , pri excitovaní vlnovou dĺžkou asi 350 nm. Indo-1 je užitočný indikátor v prietokovej cytometrii, kde je výhodnejšie meniť emisné filtre pri jednom zdroji excitácie. Je tiež vhodný najmä pre viacfarebné fluorescenčné aplikácie.[5], [12]

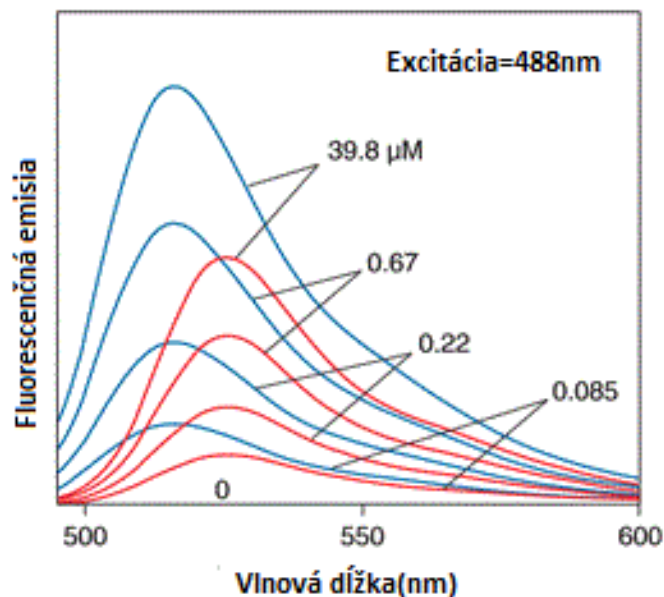


Obr. 5.6: Emisné spektrá Indo-1 pri excitácii 388 nm [12]

5.3.3 Fluo-3/Fluo-4

Ide o nepomerové a citlivé indikátory pre rýchle meranie toku vápnika v bunkách pri použití viditeľného svetla. Zavedením indikátorov fluo-3 a fluo 4 bola zobrazená a odhalená priestorová dynamika mnohých elementárnych procesov, pri ktorých má vápnik dôležitú funkciu. Tieto indikátory sú tiež vo veľkom rozsahu používané v prietokovej cytometrii, v experimentoch zahrňujúcich fotoaktiváciu a v bunkách na základe farmakologického skríningu. Najdôležitejšie vlastnosti fluo-3 a fluo-4 v týchto aplikáciách sú absorpčné spektrum v súlade s excitáciou pri 488 nm (zdroj argón-ionové lasery) a veľmi veľký nárast intenzity emisnej fluorescence po reakcii naviazania Ca^{2+} . Fluo-3, fluo-4 a všetky ich deriváty vykazujú veľké zvýšenie intenzity fluorescence po naviazaní na Ca^{2+} , ktoré dosahuje zvyčajne hodnôt väčších ako 100-násobne, než u voľného vápnika. Na rozdiel od indikátorov excitovaných ultrafialovým svetlom Fura-2 a Indo-1, neexistuje žiaden sprievodný spektrálny posun. Fluo-4 je vylepšený indikátor fluo-3, kde dva substituenty chlóru boli nahradené atómami fluóru. Táto malá modifikácia štruktúry indikátora má za následok posunutie emisného spektra z 526 nm

pre fluo-3 na 508 nm pre fluo-4, čo spôsobí rýchlejšiu a jasnejšiu emisiu po vpravení do bunky.[5], [13], [15]



Obr. 5.7: Emisné spektrá Fluo-3 (červená) a Fluo-4 (modrá) [15]

5.3.4 Výber indikátora

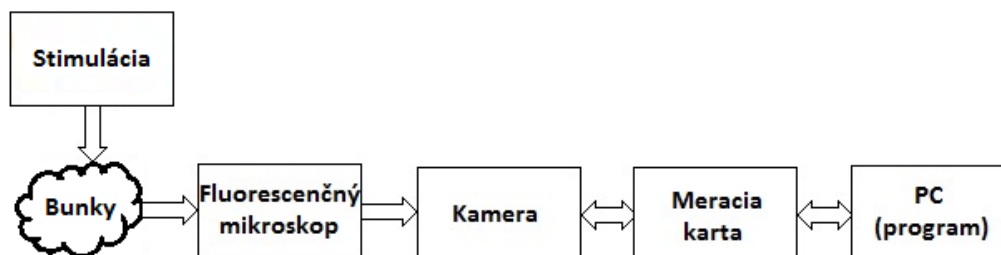
Dynamika koncentrácie intracelulárneho vápnika bude vyhodnocovaná v reálnom čase. Z dôvodu vyhodnocovania dynamiky vápnika v kardiomyocyte, ako rýchleho deja, je potrebná veľmi rýchla reakcia fluorescencečného indikátora na zmenu koncentrácie Ca^{2+} . Tejto požiadavke najviac vyhovujú zo spomenutých nepomerové indikátory Fluo-3 a Fluo-4. Vybraný Fluo-4 je dostupný a často používaný indikátor v podobných aplikáciách s veľmi rýchlou a jasnou emisiou.

6 POSTUP MERANIA DYNAMIKY Ca^{2+} V BUNKE

Meranie dynamiky intracelulárnej koncentrácie vápnika je vykonávané na kardiomyocytoch metódou fluorescenčnej mikroskopie. Experimenty sú krátke, pozorované deje relatívne rýchle a je potrebné vyhodnocovať získané informácie v reálnom čase. Z týchto dôvodov sa javí ako najvhodnejšie použiť rýchly nepomerový fluorescenčný indikátor Fluo-4. Pre meranie dynamiky nie je podstatná priestorová rozlišovacia schopnosť, ale časová rozlišovacia schopnosť, čo je dôvod použitia fluorescenčného mikroskopu. Pre potrebu veľkej časovej rozlišovacej schopnosti je obraz snímaný vysokorýchlostnou kamerou.

6.1 Merací systém

Systém pozostáva z fluorescenčného mikroskopu IX-71, z ktorého sníma obrazové dáta kamera Ixon3 860 a následne sú vyhodnocované programom vytvoreným v prostredí LabVIEW. Komunikáciu počítača s kamerou zabezpečuje meracia karta CCI-23 od firmy ANDOR. Ku kamere s meracou kartou patrí od tejto firmy tiež vývojový kit Andor SDK. Tento kit obsahuje potrebné knižnice pre prácu s kamerou a zberom dát pod operačným systémom Windows, kompatibilné s C/C++, C#, Delphi, VB.NET, Matlab a použitým LabVIEW.



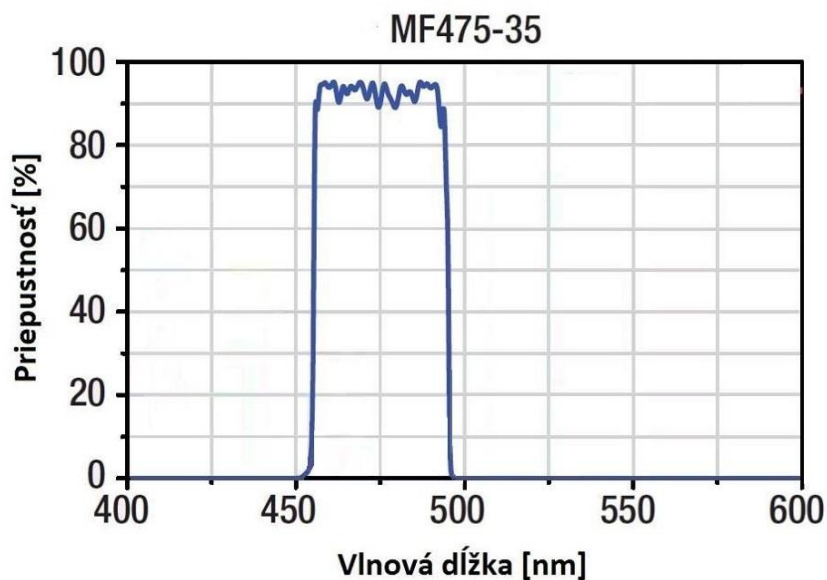
Obr. 6.1: Bloková schéma zariadenia

6.2 Prístrojové vybavenie

6.2.1 Fluorescenčný mikroskop a použité filtre

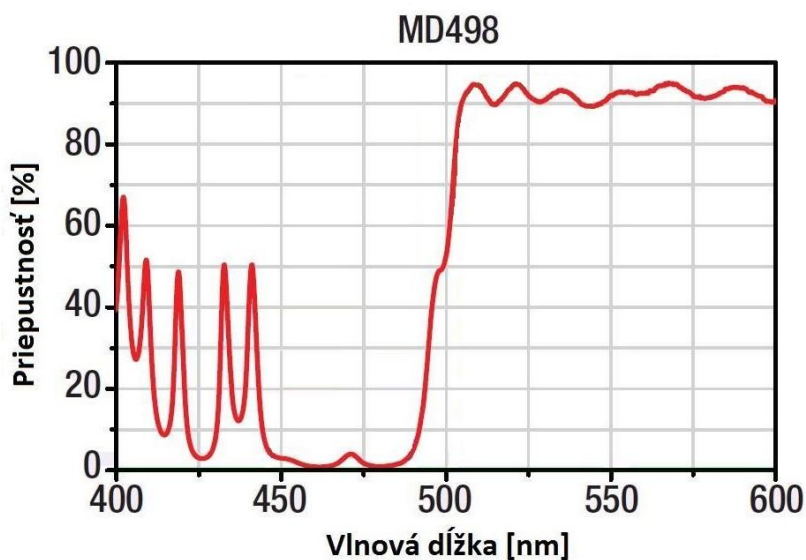
Je použitý epifluorescenčný mikroskop Olympus IX-71, ktorý disponuje ortuťovou výbojkou ako zdrojom svetla.

S mikroskopom sú použité filtre MF475-35, MD498 a MF525-39. Filter **MF475-35** je excitačný filter, ktorý slúži na výber excitačného spektra. Toto spektrum sa musí nachádzať pri 488nm. Filter MF475-35, ako jeho názov napovedá, má vysokú priepustnosť v pásme o šírke 35 nm so stredom na vlnovej dĺžke 475 nm tj. 458-492 nm.



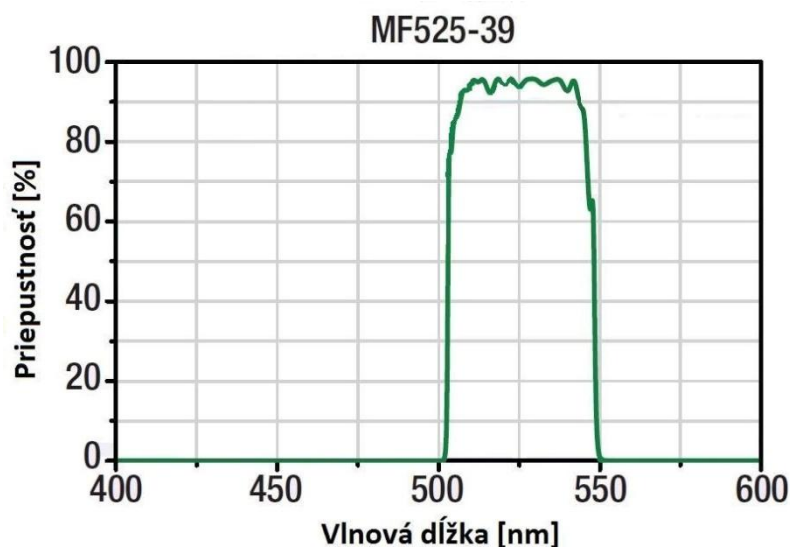
Obr. 6.2: Graf priepustnosti excitačného filtra MF475-35 [20]

Filter **MD498** je dichroický filter, ktorý odráža vlnové dĺžky kratšie ako 498 nm a dlhšie vlnové dĺžky prepúšťa.



Obr. 6.3: Graf priepustnosti dichroického filtra MD498 [20]

Filter **MF525-39** je emisný filter, ktorý vyberá z emitovaného spektra žiarenia a prepúšťa spektrum o šírke 39nm so stredom na vlnovej dĺžke 525 nm tj. 506-545 nm. Emisná vlnová dĺžka je stanovená na 508 nm takže tento filter vyhovuje požiadavkám.

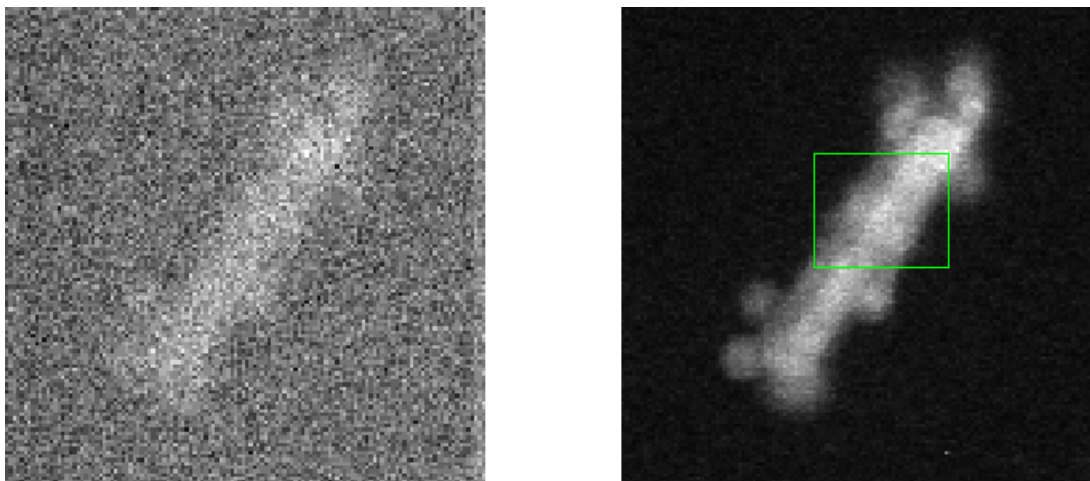


Obr. 6.4: Graf priepustnosti emisného filtra MF525-39 [20]

6.2.2 Detekčná jednotka

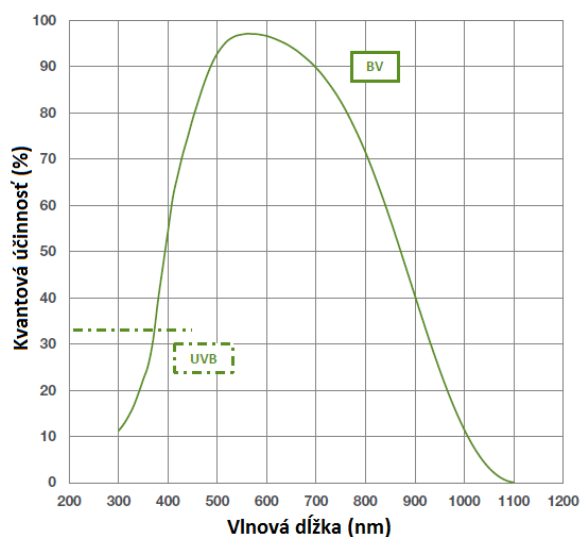
Na snímanie obrazových dát z mikroskopu používame kameru Ixon3 860 od firmy Andor. Kamera má maximálne rozlíšenie 128x128 pixelov pri veľkosti pixelu 24x24 μm a disponuje technológiou snímača ElectronMultiplyingCCD. Táto technológia v špeciálnom posuvnom registri, ktorý obsahuje dve elektródy ovládané hodinovým signálom a jednu fixnú elektródu. Druhá z hodinových elektród má omnoho väčší potenciál než je zvykom (40-60V) a veľké elektrické pole medzi fixnou a hodinami ovládanou elektródou spôsobuje ionizáciu. Jav ionizácie spôsobuje zisk sekundárnych elektrónov a tým k elektrónovému násobeniu. Toto násobenie je malé (1,01-1,015), avšak je vykonávané vo veľkom počte krokov.

Touto technológiou dochádza k prekrytiu šumu pozadia čo je ideálne pre aplikácie s vysokou snímkovacou frekvenciou. Porovnanie snímok so zosilnením a bez je znázornené na obr. 6.5. Maximálna snímacia rýchlosť kamery je 513 snímok za sekundu. [18], [19]



Obr. 6.5: Porovnanie snímku pri rozličnom zosilnení (vľavo 0, vpravo 150)

Na citlivostnom spektre (obr. 6.6) je zreteľné, že kamera má najvyššiu kvantovú účinnosť pri vlnovej dĺžke okolo 550 nm, čo je veľmi vhodné pre meranie pomocou farbív Fluo-3 alebo Fluo-4.

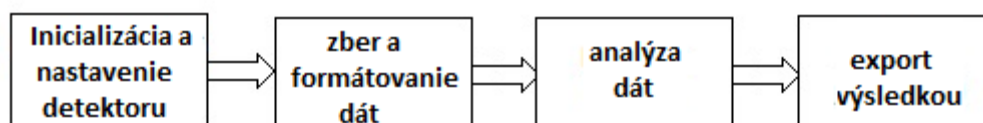


Obr. 6.6: Citlivostné spektrum kamery Ixon3 860 [18]

7 AKVIZÍCIA A ANALÝZA OBRAZU V LABVIEW

7.1 Návrh metódy

Program musí zabezpečiť komunikáciu s detektorom (kamerou), zber obrazových dát, ich správnu interpretáciu a analýzu ako aj export získaných poznatkov pre neskoršie štúdie. Na obr. 7.1 sú znázornené štyri základné bloky programu.



Obr. 7.1: Bloková schéma programu

V bloku *inicializácia a nastavenie detektora* sú získavané údaje o detektore a nastavenie potrebných režimov snímania ako aj nastavenie času expozície detektoru. Blok *zber a formátovanie dát* obsahuje funkcie pre spustenie snímania detektoru, ukladanie získaných dát do alokovanej pamäte a ich následnú úpravu do formátu vhodného k ich ďalšiemu spracovaniu. V bloku *analýza dát* prebieha výber oblasti záujmu. Ďalšia analýza sa vykonáva na vybranej oblasti záujmu. Ide o grafické interpretácie intenzity a jej priebehu v čase. Úlohou posledného bloku je *export získaných informácií* o priebehu intenzity vo vybranej oblasti záujmu v číselnej a vizuálnej podobe. Získané informácie je možné exportovať z grafov umiestnených v užívateľskom rozhraní, zobrazeného v prílohe č. 1, kliknutím pravým tlačidlom myši a vybraním voľby Export. Vizuálnou podobou je myslený videozáznam z merania vo formáte *.avi. Hlavná slučka celého programu jej zobrazená v prílohách č. 2 a 3.

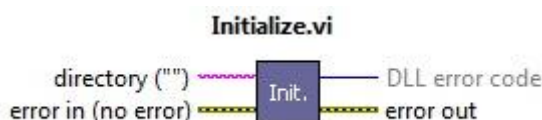
7.2 Inicializácia a nastavenie detektoru

Na obr. 7.2. sú zobrazené bloky, ktoré reprezentujú časti programu „*Inicializácia a nastavenie detektora*“. Väčšina týchto blokov obsahuje funkcie z knižníc od výrobcu detektora.



Obr. 7.2: Bloková schéma inicializácie kamerového systému

Inicializáciu detektora vykonáva funkcia `Initialize.vi`. Táto funkcia inicializuje systém Andor. Ako časť inicializačného procesu je potrebný prístup k súborom, ktoré obsahujú informácie o detektore. Pokiaľ je parameter *directory* prázdny, funkcia bude tieto súbory vyhľadávať v aktuálnom pracovnom adresári.



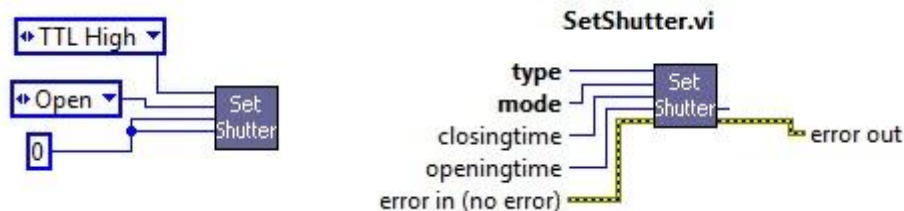
Obr. 7.3: Funkcia inicializácie

Informácie o detektore sú získané ako výstup z funkcie `GetDetector.vi`. Táto funkcia vracia ako výstup veľkosť detektoru v pixloch. *Xpixels* reprezentuje počet pixlov horizontálne a *ypixels* počet pixlov vertikálne. Výsledok násobenia týchto výstupov je celkový počet pixlov na čipe detektora. Rozmery a počet pixlov sú dôležité pre ďalšie funkcie vykonávané v programe.



Obr. 7.4: Funkcia zisťujúca rozmery detektoru

Nastavenie módu uzávierky je vykonané funkciou `SetShutter.vi`. Funkcia nastavuje, pri ktorej úrovni TTL signálu (*type*) vykoná uzávierka daný mód (*mode*) a aký by mal byť čas otvárania/zatvárania uzávierky (*openingtime/closingtime*). Na obrázku vpravo je vidieť nastavenie v programe - otváranie uzávierky pri vysokej hodnote TTL signálu. Nula pre *openingtime/closingtime* značí, že uzávierka sa má otvárať/zatvárať v najkratšom možnom čase.



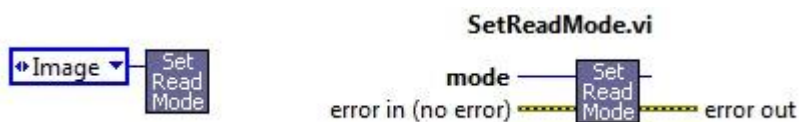
Obr. 7.5: Funkcia nastavujúca mód uzávierky

Nastavenie módu akvizície ponúka možnosť nastaviť akvizíciu na jeden samostatný snímok, snímok akumulovaný, mód „Kinetic“ vhodný pre záznam časového vývoja procesu a mód použitý v programe „Run Till Abort“, vhodný pre záznamy v reálnom čase. Pri poslednom spomenutom móde nie je pri veľmi krátkych expozíciách systém schopný ukladať každý zosnímaný obraz alebo dáta. Funkcia vykonávajúca toto nastavenie je nazvaná SetAcquisitionMode.vi



Obr. 7.6: Funkcia nastavujúca mód akvizície

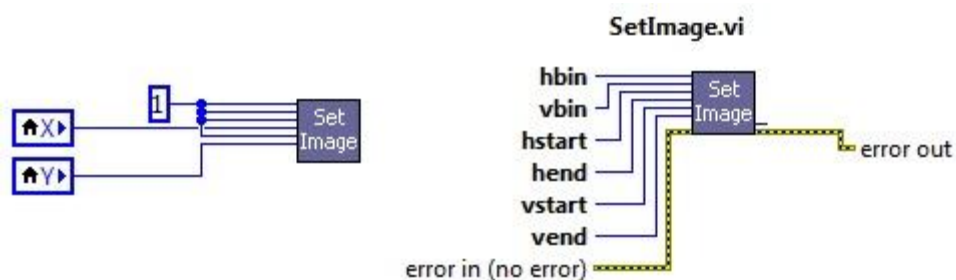
Nastavenie typu výstupu dát určuje v akej forme sú posielané dáta z čipu na výstup. Nastavuje sa pomocou funkcie SetReadMode.vi. Pri typoch „Single-track“ alebo „Multi-track“ sú dáta odosielané v jednej alebo viacerých stopách, odpovedajúcim riadkom CCD čipu, po stĺpci a následne software vypočíta polohu stopy odpovedajúcu distribúcií na čipe. Mód „Image“, tiež použitý v programe, umožňuje využiť fakt, že „readout“ register, odosielajúci zosnímané dáta, má rovnakú dĺžku ako CCD čip a odosiela dáta po celých stĺpcoch. Takto odoslané dáta sú orientované tak, ako boli nasnímané a nie je potrebné vykonávať žiadne výpočty pre zisťovanie polohy.



Obr. 7.7: Funkcia nastavujúca rozloženie výstupných dát

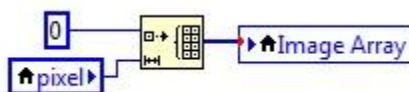
V predchádzajúcom bloku bol vybraný typ výstupu „Image“. Nasledujúci blok **Nastavenie výstupných dát**, vykonávaný funkciou SetImage.vi vymedzuje, aká časť čipu bude použitá na snímanie a nastavuje binning (spájanie) pixlov. Binningom je

možné získať väčší zisk detektoru avšak dôjde k zmenšeniu rozlíšenia obrazu. Atribútmi *hbin/vbin* sa určuje horizontálny/vertikálny binning, *hstart/vstart* určujú, od ktorého horizontálneho/vertikálneho pixlu na čipe bude obraz snímaný a *hend/vend* určujú, po ktorý pixel bude obraz snímaný. Ako je znázornené na obrázku vľavo, v programe nie je využitý binning a obraz je snímaný čipom v celom jeho rozsahu 128x128 pixlov zistenom funkciou GetDetector.vi.



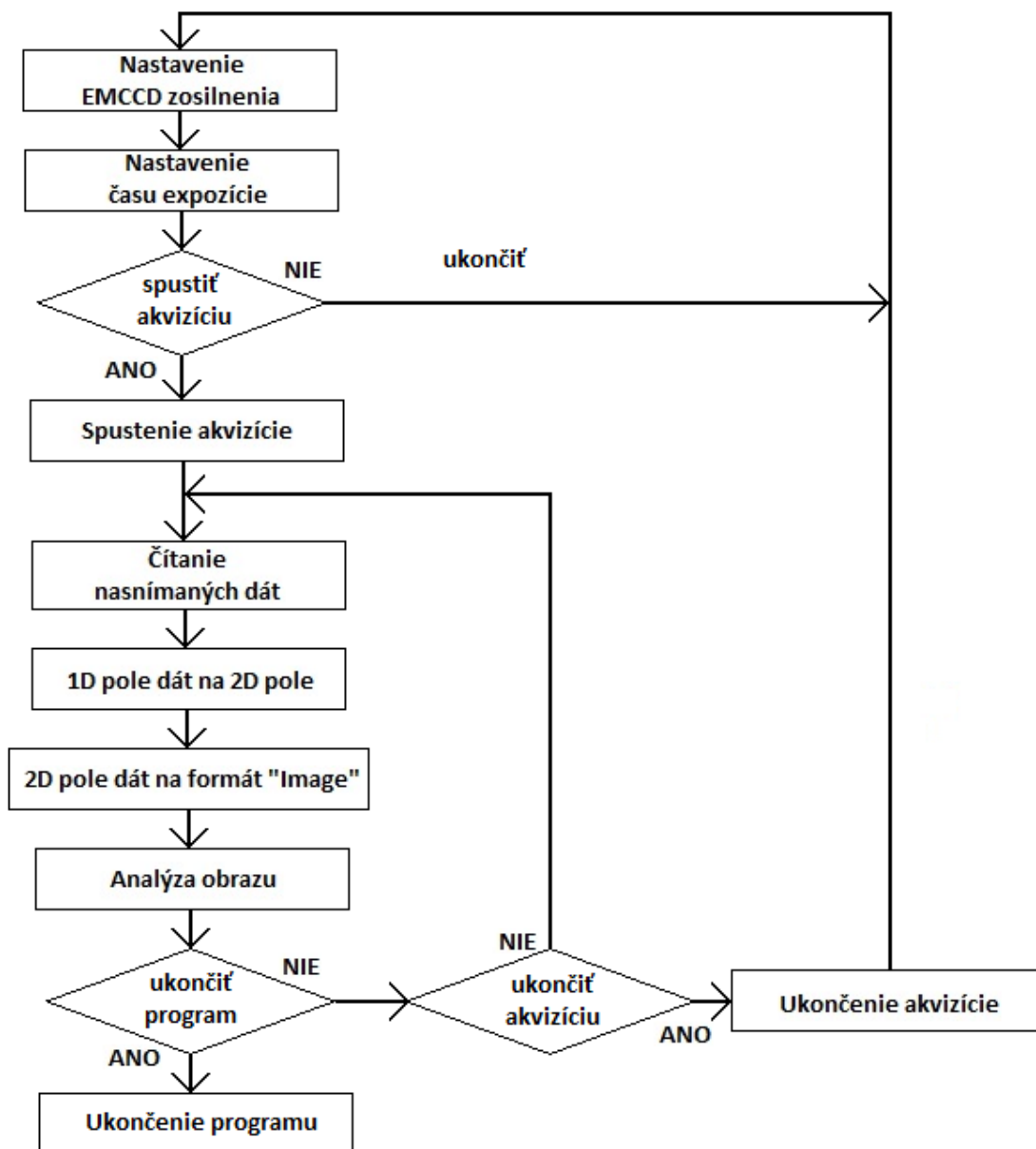
Obr. 7.8: Funkcia nastavujúca veľkosť výstupných dát

Alokácia pamäti je posledným blokom v sekcii inicializácia a nastavenie detektoru. Pred začiatkom zberu dát je potrebné alokovať v pamäti počítača miesto, kde budú ukladané dáta získané z kamery. Tieto dáta sú vo forme jednorozmerného poľa o dĺžke odpovedajúcej celkovému počtu pixlov. Funkčným blokom **Initialize Array** je vytvorené jednorozmerné pole s dĺžkou vypočítanou z výstupov funkcie GetDetector.vi.



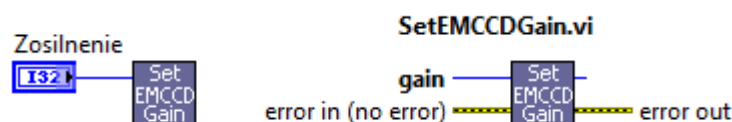
Obr. 7.9: Alokácia pamäte

7.3 Akvizícia a formátovanie dát



Obr. 7.10: Vývojový diagram akvizície a formátovanie dát

Ako je možné vidieť na vývojovom diagrame na obr. 7.10 programový blok akvizícia a formátovanie dát je zahájený **nastavením zosilnenia EMCCD snímača**. Toto zosilnenie je nastavené pomocou funkcie SetEMCCDGain.vi, ktorá je súčasťou knižnice od výrobcu kamery. Vstupom tejto funkcie je hodnota zosilnenia v rozsahu od 0-300, ktorá je zadávaná z užívateľského rozhrania premennou „Zosilnenie“.



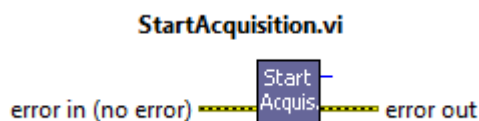
Obr. 7.11: Funkcia nastavenia zosilnenia čipu

Pre **nastavenie času expozície** je potrebná funkcia z knižnice výrobcu kamery SetExposureTime.vi. Hodnota na vstupe *time* reprezentuje čas po ktorý bude otvorená clona snímača pri snímaní jedného snímku. V programe je expozícia volená premennou z užívateľského rozhrania. Zadávaná hodnota je v milisekundách avšak hodnota na vstupe *time* je braná v sekundách, preto je potrebné zadávanú hodnotu deliť hodnotou 1000 pred privedením na vstup funkcie.



Obr. 7.12: Funkcia nastavenia času expozície

Program následne čaká na pokyn k začatiu akvizície od prepínača typu boolean z užívateľského rozhrania. Pokiaľ je prepínač v stave *false* akvizícia nie je spustená a stále je možné meniť nastavenia pre zosilnenie a expozíciu. Po prepnutí prepínača do stavu *true* dôjde k spusteniu akvizície a nie je už možné zasahovať do nastavenia zosilnenia či expozície. Akvizícia je spustená funkciou StartAcquisition.vi, ktorá je obsiahnutá v knižniciach výrobcu kamery.



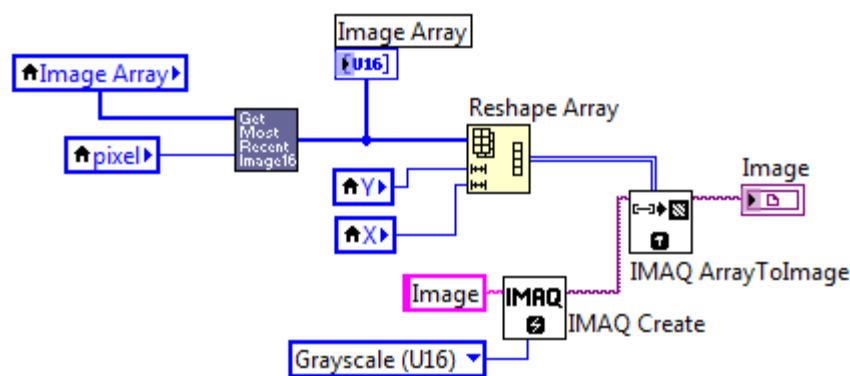
Obr. 7.13: Funkcia spúšťajúca akvizíciu

Po začatí akvizície sú dáta snímané kamerou získané funkciou GetMostRecentImage16.vi. Táto funkcia má dva vstupné parametre. Prvým je parameter array, ktorý je ukazovateľom miesto alokované v pamäti pri inicializácii. Druhý parameter je size, ktorý je potrebné naplniť hodnotou celkového počtu pixlov. Táto hodnota je získaná pri inicializácii kamerového systému funkciou GetDetector.vi. Výstupom funkcie je 1D pole hodnôt typu „unsigned word integer“ o dĺžke počtu pixlov

reprezentujúcich zosnímanú scénu. Toto pole je uložené do alokovaného pamäťového priestoru a ďalej spracovávané.

Je potrebné získané dáta previesť do formy 2D poľa. K tomu slúži funkcia Reshape Array, na ktorej vstup *array* sú privedené získané dáta vo forme 1D poľa. Ďalšími vstupnými parametrami funkcie sú rozmery poľa, do ktorého majú byť hodnoty preukladané. Tieto hodnoty boli získané pri inicializácii funkciou GetDetector.vi.

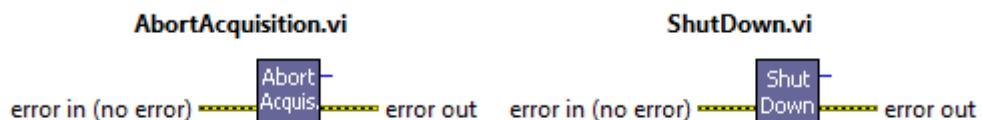
Dvojrozmerné pole hodnôt získané z výstupu funkcie Reshape Array slúži ako vstup pre funkciu IMAQ ArrayToImage. Táto funkcia prevádza dvojrozmerné pole hodnôt na obrazový formát. Obrazový formát je dôležitý z hľadiska ďalšieho spracovania dát. Neopomenuteľným vstupom funkcie je ukazovateľ na alokovaný pamäťový priestor pre obraz v požadovanom dátovom type, ktorý je vytvorený funkciou IMAQ Create.



Obr. 7.14: Zber a konverzia dát na typ Image

Ako vidieť na vývojovom diagrame na obr. 7.10 program pokračuje analýzou obrazových dát, ktorá bude podrobne predstavená v nasledujúcej kapitole. Program testuje boolean hodnotu prepínača Akvizícia umiestneného v užívateľskom rozhraní. V prípade, hodnoty *true* program sa cyklicky opakuje od bloku čítania nasnímaných dát reprezentovaného funkciou GetMostRecentImage16.vi. V prípade hodnoty *false* je volaná funkcia AbortAcquisition.vi, ktorá ukončí akvizíciu a chod programu je presunutý na začiatok bloku akvizície a formátovania dát.

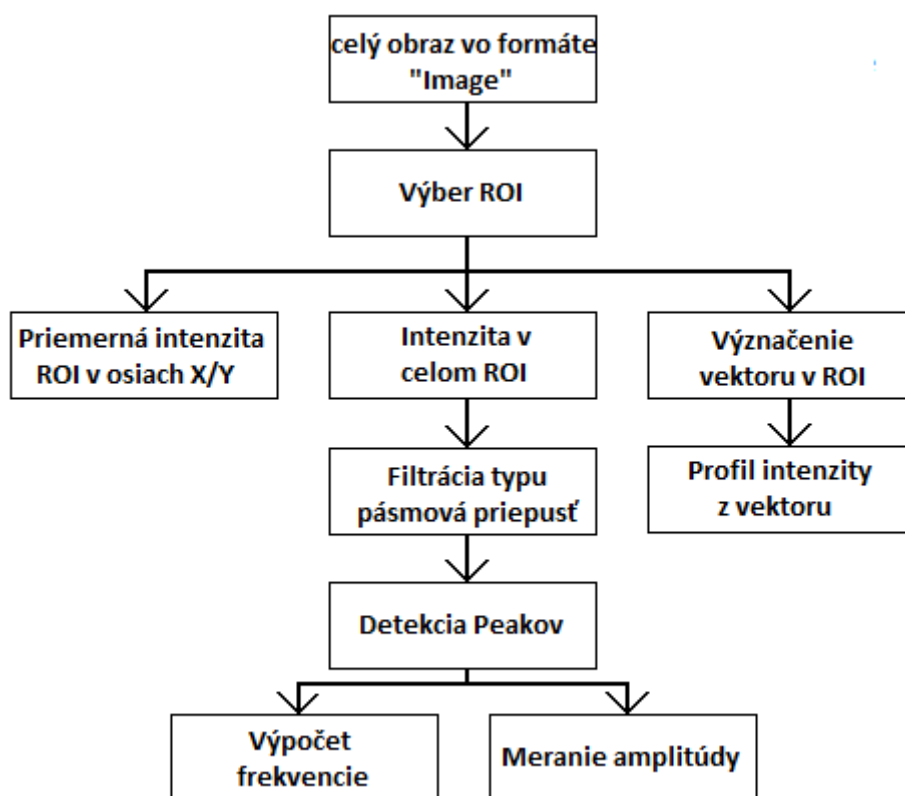
Počas behu programu je možné tlačidlom Koniec v užívateľskom rozhraní vyskočiť z cyklu a volať funkciu ShutDown.vi, ktorá ukončí nie len akvizíciu ale aj program a vypne systém Andor.



Obr. 7.15: Funkcia ukončenia akvizície (vľavo) a ukončenia programu (vpravo)

7.4 Analýza obrazu

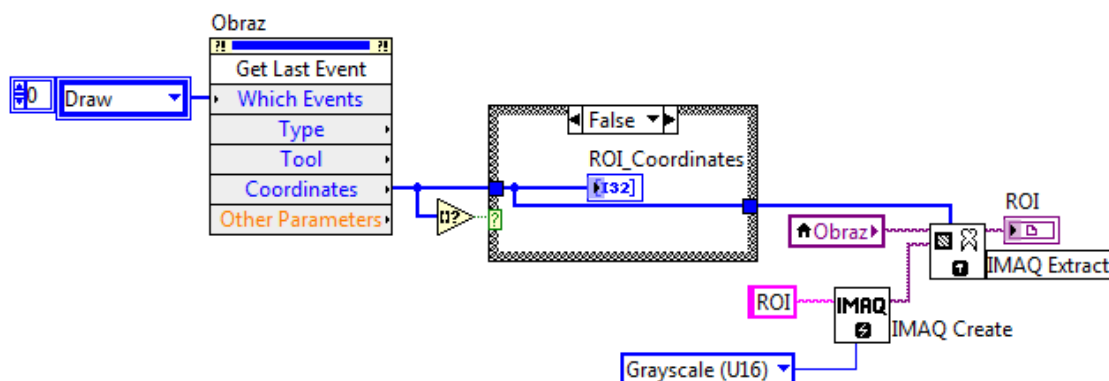
Obraz získavaný kamerovým systémom môže obsahovať aj objekty, ktoré nie sú pre analýzu významné alebo môžu nepriaznivo ovplyvňovať výslednú analýzu. Z toho dôvodu je potrebné vybrať z obrazu tú časť, ktorá je pre analýzu predmetná - region of interest (ROI). Následná analýza ROI pozostáva z merania intenzity žiarenia a jej dynamiky v reálnom čase a výpočtu frekvencie oscilácií vápniku a veľkosti zmeny intenzity pri osciláciách. Pre výpočet týchto veličín je potrebné detekovať peaky v priebehu intenzity v maxime a v minime pri osciláciách. Na obr. 7.16 je zobrazená bloková schéma časti programu určená pre analýzu obrazov a signálov.



Obr. 7.16: Bloková schéma pre analýzu obrazu

Výber ROI

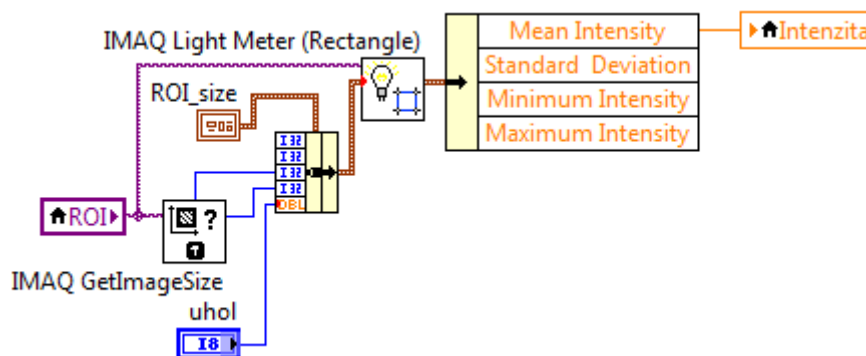
Program zabezpečuje aby po vytýčení štvoruholníka v oblasti obrazového displaya pomenovaného „Obraz“ na užívateľskom rozhraní, bola táto oblasť zobrazená taktiež obrazovým displayom pomenovaným ROI. K tomu je potrebný programový prvok Invoke Node, ktorý je naviazaný na obrazový display *Obraz*. Tento prvok používa metódu *GetLastEvent*, ktorá vracia informácie o najaktuálnejšej udalosti vykonanej na obraze. Zvolený typ udalosti je *Draw*, takže po kliknutí myši a označení oblasti sa na výstupe objavia koordináty vytýčenej oblasti. Metóda koordináty nezaznamenáva, preto je potrebné ich zaznamenať do premennej, ktorá je pomenovaná *ROI_coordinates* a ako náhle metóda posielá na výstup prázdne pole prepne sa case štruktúra na hodnotu *true* a zaznamenané koordináty sa naďalej posielajú na vstup funkcie *IMAQ Extract*. Tá má na ďalší vstup privedený obraz, s ktorého podľa zadaných koordinátou funkcia vytvorí nový obraz. Keďže na výstupe sú nové obrazové dáta je potrebné funkcií zadať ukazovateľa na alokované miesto v pamäťovo priestore, ktoré je vytvorené funkciou *IMAQ Create*



Obr. 7.17: Výber ROI

Intenzita v celom ROI

Veličina, ktorú je potrebné merať a vyhodnocovať je intenzita žiarenia zvolenej oblasti záujmu. K tomu slúži funkcia *IMAQ LightMeter*, na ktorej vstupy sú privedené obraz ROI a zoskupovací prvok cluster, ktorý obsahuje zistené rozmery ROI a možnosť oblasť záujmu pootočiť voľbou uhlu natočenia v užívateľskom rozhraní. Výstupom z funkcie je taktiež cluster, ktorý obsahuje hodnoty veličín týkajúce sa intenzity v obraze ako smerodajná odchýlka, minimálna či maximálna hodnota intenzity a strednú hodnotu intenzity. Posledná spomenutá je potrebná k ďalšej analýze.



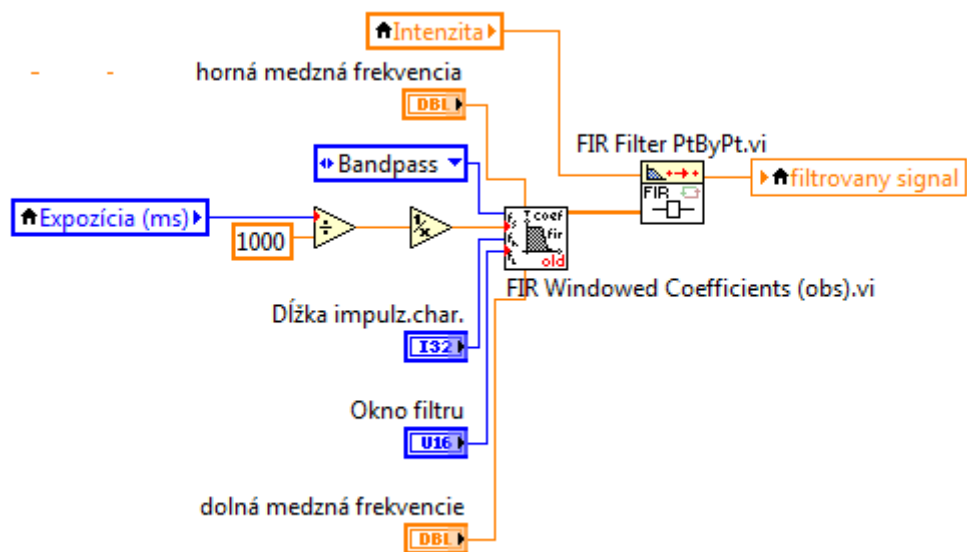
Obr. 7.18: Celková intenzita ROI

Filtrácia

Priebeh intenzity získavaný z predchádzajúceho bloku môže obsahovať kontinuálne nemenné žiarenie od vápnika naviazaného na indikátor mimo bunku, čo zvyšuje jednosmernú zložku signálu a vysoká citlivosť snímacieho čipu má za následok šum (vysoké frekvencie) v obraze.

Spomínané nežiaduce zložky signálu sú odstránené pomocou filtra typu pásmová priepusť. Zvolený filter je FIR (Finite Impulse Response), teda filter s konečnou impulznou charakteristikou. Na rozdiel od filtra s nekonečnou impulznou charakteristikou (IIR) nemá FIR filter spätnú väzbu a má lineárnu fázovú charakteristiku, takže zaručuje stabilitu a malé skreslenie signálu. Avšak s konečnou impulznou charakteristikou je spojené oneskorenie filteru o jej dĺžku.

Nastavenie filteru ako pásmovej priepuste je fixne zadane v programe. Vzorkovacia frekvencia sa vypočíta ako prevrátená hodnota času expozície. Ďalšie parametre filteru ako dĺžka impulznej charakteristiky, váhové okno, horná a dolná medzná frekvencia sú zadávané z užívateľského rozhrania. Takto zadane parametre spracuje funkcia FIR Windowed Coefficients a vypočíta koeficienty FIR filteru. Funkcia FIR Filter PtByPt.vi podľa zadane koeficientov spracuje vstupný signál (časový priebeh intenzity). Keďže ide o analýzu v reálnom čase, používané funkcie spracovávajú signál bod po bode.



Obr. 7.19: FIR filter typu pásmová priepust'

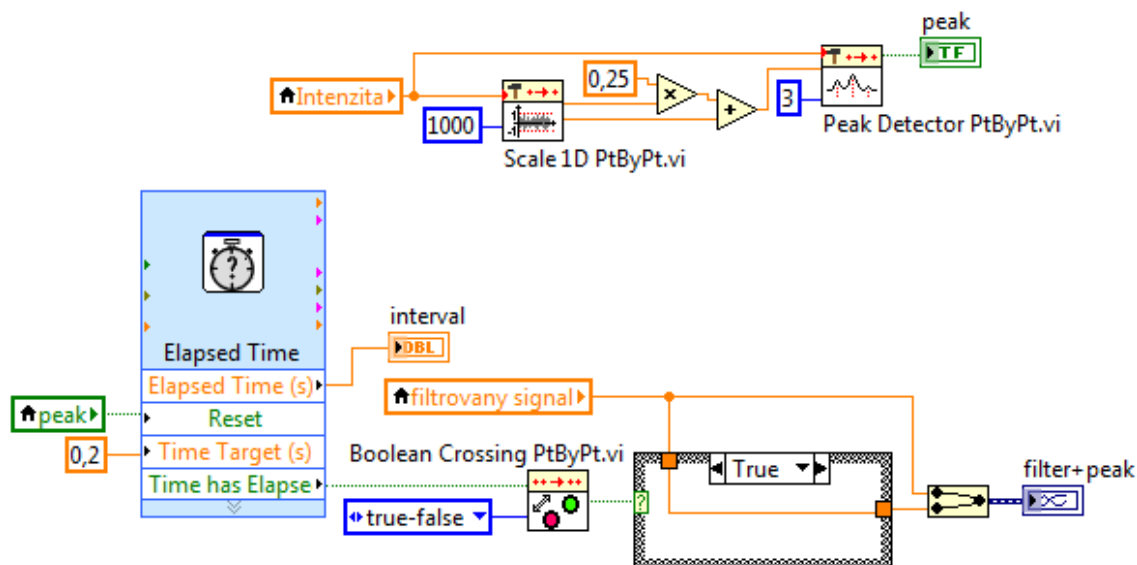
Detekcia peakov

Po vyhladení je nutné detegovať peaky vo filtrovanom signále. Na to slúži funkcia Peak Detector PtByPt.vi. Táto funkcia však potrebuje ako vstupný parameter prahovú hodnotu od ktorej má testovať priebeh a detegovať peaky. Prahová hodnota je vypočítaná z priebehu signálu pomocou funkcie Scale1D PtByPt.vi. Funkcia má pevne zadanú vzorkovaciu dĺžku na 1000. To znamená že zo 1000 posledných vzoriek vypočíta hodnotu *offset*, teda veľkosť posunutia všetkých vzoriek tak aby ich stredná hodnota bola nulová a hodnotu *scale*, ktorá reprezentuje rozdiel medzi minimálnou a maximálnou hodnotou s pomedzi vzorkou. Hodnota *scale* je vynásobená konštantou 0,25 a pripočítaná k hodnote *offset*. Výsledkom týchto operácií je stanovenie prahu pre detegovanie peakov na 75% rozsahu v posledných 1000 vzorkách. 1000 vzoriek je použitých s dôvodu že interval medzi dvoma za sebou idúcimi peakmi môže trvať niekoľko sekúnd a v prípade že by sa predchádzajúci peak nenachádzal v okne 1000 vzoriek dôjde k chybným detekciám peaku. Pri detekcii peaku nastaví Peak Detector premennú *peak* typu boolean na hodnotu *true*.

Vyhladenie signálu filtrom nemusí byť dostačujúce a môžu sa objaviť vo filtrovanom priebehu zákmity na vrchu amplitúdy čo by pri citlivom PeakDetektore znamenalo detekciu falošných peakov a znehodnotilo tak meranie.

Pre ošetrenie tohto javu je premenná *peak* privedená na resetovací vstup bloku Elapsed Time, kde pri každej hodnote *true* resetuje stopky. Hodnota parametru *Time Target (s)*, pevne nastavená na 0,2 sekundy, spôsobuje že po privedení resetovacieho impulzu stopky počas tohto časového intervalu nereagujú na ďalšie resetovanie. Z vynulovaním stopiek sa mení hodnota výstupu *Time has Elapse* z *true* na *false*, čo je

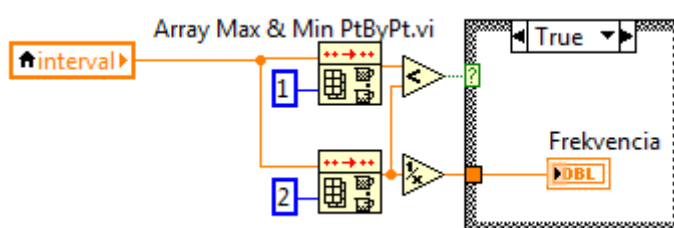
využívané funkciou Boolean Crossing PtByPt.vi k detekcii peaku, ktorý je následne vyznačený v grafickom Waveform Chart spolu s filtrovaným signálom.



Obr. 7.20: Detekcia a vyznačenie peakov

Výpočet frekvencie oscilácií

Použitím bloku Elapsed Time získavame tiež časový interval medzi jednotlivými maximálnymi peakmi z výstupu *Elapsed Time(s)* a z časového intervalu vypočítame recipročnú hodnotu - frekvenciu oscilácií. Hodnota času neustále narastá až do resetovacieho impulzu. Je sledovaná dvomi funkciami s rozdielnymi šírkami okna hľadajúcimi maximálnu hodnotu. Pokiaľ je maximálna hodnota vo funkcii s kratším oknom, maximálna hodnota pri širšom okne je časový interval medzi osciláciami.

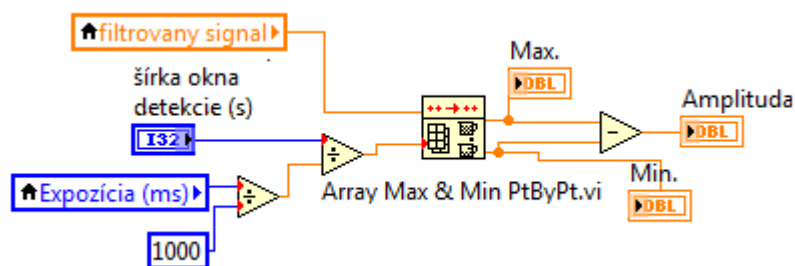


Obr. 7.21: Výpočet frekvencie oscilácií

Meranie amplitúdy oscilácií

Filtrovaný signál je privádzaný na vstup funkcie Array Max & Min, ktorá vracia maximálnu a minimálnu hodnotu zo signálu o zadanej šírke vzorkovacieho okna. Šírka okna je zadaná cez užívateľské rozhranie. Pre lepšiu orientáciu ju užívateľ zadáva v sekundách a následne je v programe prepočítaná na počet vzoriek vynásobením

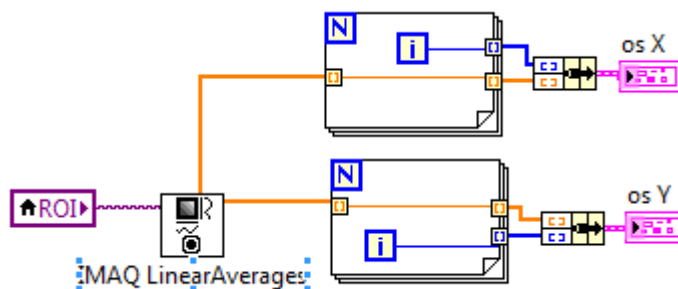
vzorkovacou frekvenciou. Výstup z tejto funkcie je zobrazovaný v užívateľskom rozhraní ako maximum a minimum amplitúdy a rozdiel týchto dvoch hodnôt.



Obr. 7.22: Meranie amplitúdy oscilácií

Priemerná intenzita riadkov/stĺpcov

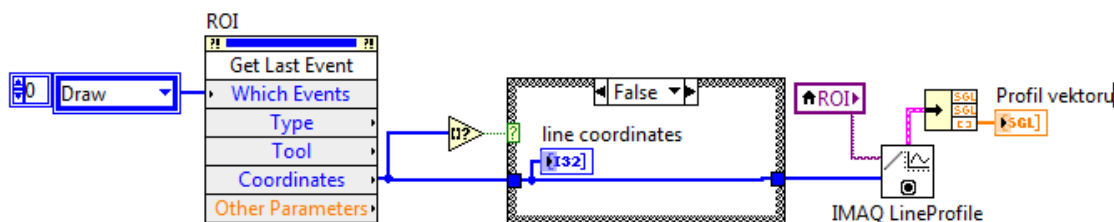
Na vstup funkcie IMAQ LinearAverages je privedený obraz, z ktorého funkcia vypočíta priemernú hodnotu každého riadku a stĺpca. Tieto hodnoty vracia zvlášť pre riadky a zvlášť pre stĺpce, ktoré však nie sú indexované, preto je potrebné priradiť im index pomocou štruktúr ForLoop, aby mohli byť zobrazené grafom. Tento blok má iba informatívny charakter.



Obr. 7.23: Priemerná intenzita riadkov/stĺpcov

Profil intenzity vektoru v ROI

Pre získanie hodnôt intenzity profilu vektoru je nutné najskôr tento vektor vybrať v obraze ROI. Po vyznačení úsečky v ROI pomocou myšky je táto udalosť zaznamenaná prvkom Invoke Node využívajúcim metódu GetLastEvent. Výstupom tejto metódy sú koordinácie vyznačenej úsečky, ktoré slúžia ako vstup pre funkciu IMAQ LineProfile, ktorá na základe týchto koordinát vytvorí zo vstupného obrazu ROI cluster. Tento cluster obsahuje úsečkový profil vypočítaný z poľa, ktorého elementy reprezentujú hodnotu pixlu patriaceho vektoru. Tento blok má informatívny charakter.



Obr. 7.24: Profil intenzity vektoru

7.5 Uživatelské rozhranie

V prílohe č. 1 je znázornené grafické užívateľské rozhranie programu pre RT akvizíciu, analýzu a vyhodnotenie obrazov z kamerového systému a signálov. Jeho úlohou je zjednodušiť užívateľovi prácu na fluorescenčnom mikroskope, predovšetkým pri meraní dynamiky koncentrácie intracelulárneho vápnika. Rozhranie je rozdelené do desiatich blokov, z ktorých každý plní určitú funkciu. Tieto bloky sú označené na obrázku číslami v bielom krúžku.

Prvý blok obsahuje indikačné a ovládacie prvky. Indikačná časť pozostáva z informácií o veľkosti snímacieho čipu v pixloch a z kontrolky „Stav systému“. Po spustení programu sa vykonáva inicializácia kamery v priebehu ktorej nie je možné vykonávať akvizíciu. Oznamuje o tom kontrolka Stav systému, ktorá svieti na červeno. Vykonaním funkcie GetDetector.vi počas inicializácie sa získajú z kamery informácie o veľkosti čipu, ktoré sa zobrazia v grafickom užívateľskom rozhraní. Pokiaľ inicializácia neprebehne úspešne, program sa automaticky zastaví. V opačnom prípade zmení kontrolka Stav systému farbu na zelenú a systém je pripravený vykonávať akvizíciu a analýzu dát. Súčasťou prvého bloku sú kontrolné prvky pre spúšťanie akvizície, analýzy dát, nahrávanie videa a tlačidlo pre ukončenie chodu programu „KONIEC“.

Druhým blokom sú číselné kontrolné prvky zadávania zosilnenia čipu kamery a času expozície v ms. Tieto kontrolné prvky nemajú žiadny vplyv na akvizíciu pokiaľ sú nastavované za chodu akvizície.

Po spustení akvizície prepínačom „Akvizícia“ nemajú kontrolné prvky druhého bloku žiaden efekt na získaný obraz. Zároveň sa týmto prepínačom spustí akvizícia a získaný obraz sa zobrazí v *treťom bloku*. V tomto obraze je možné pomocou myšky vybrať požadovanú oblasť záujmu. Táto označená oblasť sa zobrazí ako obraz ROI v *štvrtom bloku*. Automaticky prebehne výpočet a zobrazenie priemernej intenzity riadkov a stĺpcov (X, Y). V prípade, že skúmaný preparát nie je rovnobežný s osami obrazu, je možné oblasť ROI natočiť podľa potreby o uhol rozsahu 0-90° kontrolným prvkom, ktorý sa nachádza na pravo od obrazu.

V prípade vyznačenia vektoru v ROI sa v *piatom bloku* zobrazí čiarový profil tohto vektoru. Profil vektoru a priemerná intenzita riadkov a stĺpcov sú informatívneho charakteru.

Bloky šesť až desať začnú vykonávať činnosť až po zmene stavu prepínača s názvom „Analýza“. V *bloku šesť* sa v tom momente začne zobrazovať časový priebeh intenzity celého ROI.

Siedmy blok slúži na nastavenie filtra typu pásmová priepusť. Sú v nej numerické ovládacie prvky s možnosťou nastavenia dĺžky impulznej charakteristiky filtra hornou a dolnou medznou frekvenciou a výberu váhového okna.

V *ôsmom bloku* sa vykresľuje časový priebeh intenzity spracovaný filtrom nastaveným v predchádzajúcom bloku s vyznačenými maximálnymi peakmi.

V *deviatom bloku* sa vykresľuje krivka znázorňujúca zmeny frekvencie oscilácií vápnika.

Posledný *desiaty blok* obsahuje tri indikačné prvky reprezentujúce maximálnu a minimálnu hodnotu oscilácie vápnika vzhľadom na nulovú os a rozdiel týchto dvoch hodnôt. Pre výpočet týchto hodnôt je dôležité nastavenie šírky okna detekcie, pre ktorý slúži kontrolný prvok umiestnený v tomto bloku.

8 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

8.1 Izolácia kardiomyocytov

Kardiomyocyty boli získané z dospelých potkanov metódou enzymatickej disociácie. Pri tejto metóde je explantované potkanie srdce kanilou cez aortu preplachované silným roztokom Tyrode. Preplachovanie zabezpečuje peristaltická pumpa pri konštantnom prietoku 5 ml/min po dobu 30 sekúnd. Následne boli srdečné komory rozdelené na malé fragmenty a vložené na 30 sekúnd do roztoku Tyrode-kolagenázy. Neskôr bolo médium nahradené štandardným roztokom Tyrode. Po 10-tich sekundách je sediment obsahujúci bunky vyfiltrovaný a vložený do silného roztoku Tyrode. Po izolácii je potrebné vykonávať experimenty v čo najkratšej dobe z dôvodu zhoršovania ich fyziologického stavu a umierania.

Tyrode je roztok, ktorého zloženie a hlavne koncentrácia prítomných iónov je takmer rovnaké ako roztok vyplňujúci medzibunkový priestor. Používa sa hlavne pri experimentoch s tkanivovými kultúrami a pri fyziologických pokusoch.

8.2 Príprava vzoriek

Kardiomyocyty v nádobe s roztokom Tyrode boli vyňaté z chladničky a pipetou bol odobraný približne 1 ml sedimentu uloženého na dne nádoby, ktorý obsahoval značné množstvo kardiomyocytov. Následne bol obsah pipety vložený do skúmavky. Z chladničky bola vyňatá skúmavka s fluorescenčným indikátorom Fluo-4 AM. Z tohto indikátora boli pipetou odobrané 4 mikrolitre a pridané do skúmavky ku kardiomyocytom. Skúmavka bola doplnená roztokom Tyrode a obsah bol premiešaný. Ďalej sa postupovalo dvoma metódami. Prvá metóda spočívala v inkubácii vzorky po dobu 30 minút v tmavom prostredí. Po uplynutí tohto času bol zo dna skúmavky pipetou odobraný sediment kardiomyocytov a uložený na Petriho misku. Takto pripravená vzorka bola pripravená na pozorovanie pod mikroskopom.

Čo sa týka druhej metódy, inkubácia prebiehala po dobu 15 minút. Po uplynutí tohto času bol z vrchnej časti skúmavky pipetou odňatý roztok tak, aby sediment ostal v skúmavke. Do skúmavky bol následne doliaty roztok Tyrode a obsah bol premiešaný. Potom bola zo skúmavky pipetou odobraná vzorka uložená na Petriho misku pripravená na pozorovanie.

8.3 Elektrostimulácia

Živé kardiomyocyty pozorované pri experimente nevykazovali vysokú aktivitu, preto pre zvýšenie ich aktivity bola použitá stimulácia elektrickým prúdom. Ako zdroj elektrostimulačných impulzov bol použitý dostupný generátor obdĺžnikových impulzov s možnosťou nastavenia frekvencie impulzov a ich amplitúdy. Generátor disponoval elektródami z grafitu, ktoré boli ponorené do Petriho misky obsahujúcej pozorovanú vzorku.

8.4 Priebeh experimentov

Petriho miska s pripravenými vzorkami bola uložená pod mikroskop. Bol zvolený objektív so štvornásobným zväčšením a bolo zapnuté napájanie ortuťovej výbojky. V ďalšom kroku bolo zapnuté prídavné osvetlenie pre lepšiu identifikáciu živých buniek. Po nájdení vhodnej bunky na analýzu bolo vypnuté prídavné osvetlenie a spustený program na analýzu. Ďalej bola v programe spustená iba akvizícia, počas ktorej sa bunka správne zamerala a zaostrila. Následne bolo na obraze bunky vyznačené ROI a bola spustená analýza obrazových dát. V prípade slabšej excitability buniek boli do roztoku ponorené uhlíkové elektródy vzdialené od seba približne 1 cm a spustená elektrostimulácia buniek. V prípade nevyhovujúcich výsledkov experimentov bol do roztoku pridaný vápnik.

8.5 Experimenty offline

Cieľom offline experimentov je zhotovenie častí programu, ktorý bude využívaný pre experimenty na živých kardiomyocytoch v reálnom čase. Tento program disponuje taktiež užívateľským rozhraním, ktoré je zobrazené v prílohe č. 4. Program pre offline experimenty slúži pre vývoj funkčných blokov. Na rozdiel od programu pre experimenty v reálnom čase je ochudobnený o bloky zahrňujúce komunikáciu s kamerovým systémom. Namiesto týchto blokov obsahuje bloky pre získavanie obrazových dát z videosúboru formátu *.avi. Obsahuje tiež funkčné bloky analýzy obrazu totožné s hlavným programom, a to bloky meranie intenzity v celom obraze, filtrácia signálu časového priebehu intenzity, detekcia a značenie peakov, výpočet frekvencie oscilácií a výpočet amplitúdy oscilácií. Blokový diagram programu je znázornený v prílohe č. 5.

Analýza je vykonávaná na dvoch videosúboroch, ktoré sú k dispozícii. Obe nahrávky sú videozáznamy z merania intenzity fluorescencie na fluorescenčnom mikroskope. Na prvom videozázname je pozorovaná bunka kardiomyocytu s relatívne

pomalými osciláciami vápnikových transientov. Na druhom zázname sa nachádza bunka s pridaným kofeínom, ktorej sa frekvencia oscilácií transientov v priebehu času znižuje. Tieto záznamy slúžia k odladeniu programu a ku zisteniu vhodných parametrov pre analýzu obrazu v reálnom čase.

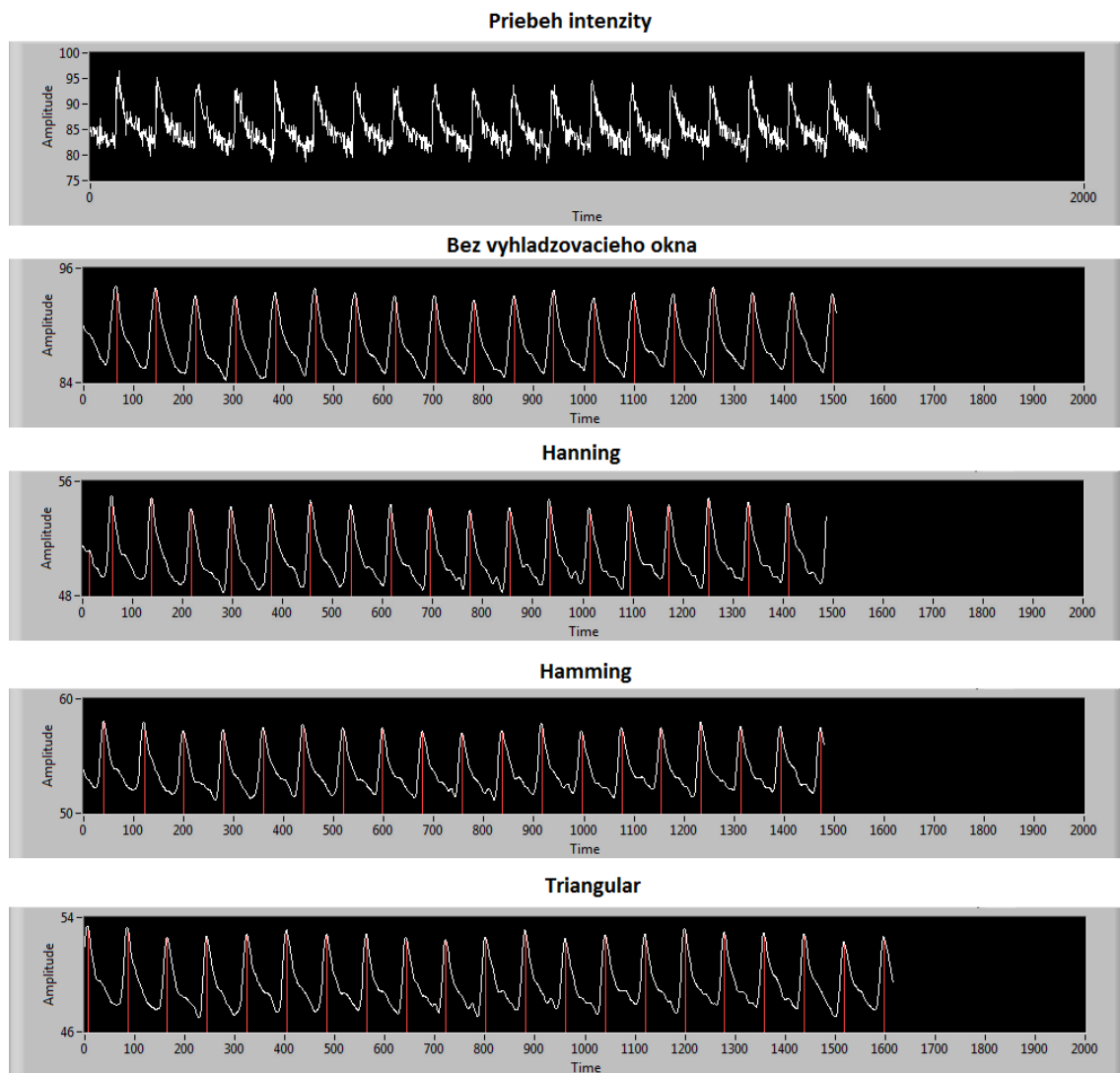
8.6 Vyhodnotenie experimentov

8.6.1 Experimenty offline

Tieto experimenty splnili očakávanú úlohu a boli nápomocné pri vývoji a ladení funkčných blokov pre analýzu obrazových dát. Výsledky získané pri offline experimentoch poskytli užitočné informácie, ktoré boli následne použité ako inicializačné parametre pre analýzu v reálnom čase. Medzi tieto parametre patria hlavne premenné slúžiace k nastaveniu filtra typu pásmová priepusť k filtrácii signálu celkovej intenzity obrazu. Boli vykonané merania zamerané na zistenie vhodných vstupných parametrov filtra, ktoré boli zadávané cez užívateľské rozhranie zobrazené v prílohe č. 4. Porovnávané boli nastavenia filtrov pre rôzne medzné frekvencie, váhové okná, dĺžky impulznej charakteristiky a vzorkovacie frekvencie.

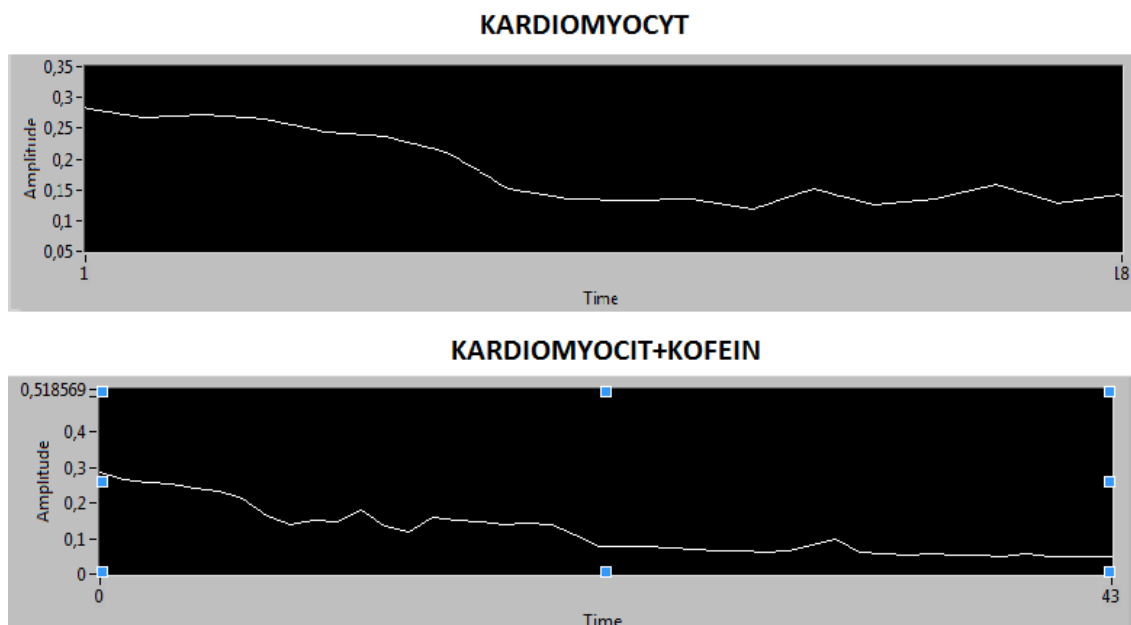
Na obr. 8.1 je znázornené porovnanie filtrov s voľbou parametra váhového okna. Hodnoty ostatných parametrov boli volené pre čo najvernejší priebeh ich výstupu. Najlepšie výsledky vykazoval filter s parametrami:

- vzorkovacia frekvencia 200 Hz,
- dolná medzná frekvencia 0,25 Hz, pre odstránenie kolísania izolácie priebehu.
- horná medzná frekvencia 7 Hz, pre odstránenie šumovej zložky signálu
- dĺžka impulznej charakteristiky 21, dlhšia impulzná charakteristika už nemala výrazný vplyv výsledný signál a cieľom bola čo najkratšia z dôvodu neoneskorovania filtrovaného signálu.
- obdĺžnikové váhové okno, ktoré bolo zistené porovnávacím testom predstaveného v nasledujúcich riadkoch.



Obr. 8.1: Porovnanie filtrov s rôznymi váhovými oknami

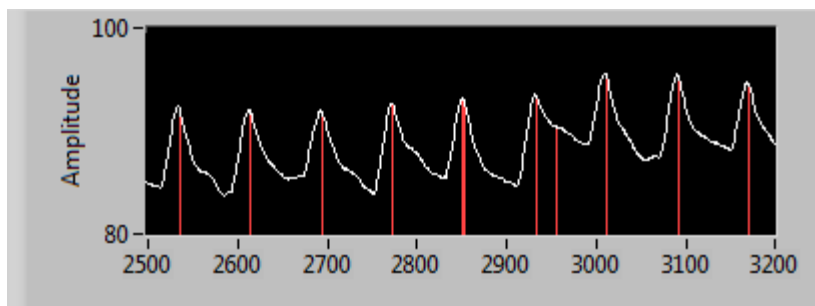
Pre filter s nastavením parametrov pre najvernejšiu podobu výsledného signálu boli vykonané merania na oboch dostupných záznamoch. Ako bolo spomínané frekvencia oscilácií pre **kardiomyocyt s kofeínom** je na rozdiel od **samotného kardiocyty** na začiatku záznamu vyššia a s postupom času sa interval medzi osciláciami predlžuje. Časť priebehu merania „kardiomyocyt+kofeín“ je zobrazený ako príloha č. 9. Nameraný priebeh zmeny frekvencie bol pre samotný kardiomyocyt na začiatku záznamu 0,27Hz a postupne klesal na hodnotu 0,14Hz. Pre bunku s kofeínom boli namerané hodnoty na začiatku záznamu 0,3 Hz a postupom času klesali až na hodnotu 0,09 Hz. Získané informácie o zmene frekvencie sú zobrazené na obr. 8.2.



Obr. 8.2: Časový priebeh zmeny frekvencie oscilácií

Po klesnutí na túto hodnotu bunka prestala oscilovať a zvýšila sa koncentrácia vápnika v intracelulárnom priestore, čo indikuje nesprávnu funkčnosť bunky. Po uplynutí určitej doby bunka nárazovo vypustila veľké množstvo vápniku z intracelulárneho priestoru mimo bunku a ten bol následne rozptýlený do roztoku. Tým je možné konštatovať uhynutie bunky. Celý priebeh merania je znázornený v prílohe č. 10.

Pri tomto meraní tiež bolo pozorované, že so znižujúcom sa frekvenciou oscilácií klesala aj amplitúda týchto kmitov a stúpala ich izolínia, tak že maximum amplitúdy priebehu sa výrazne nemenilo ale stúpalo minimum. Tento jav je pripisovaný tomu, že koncentrácia vápnika v obraze je nemenná ale bunka postupom času zo seba vypudzuje vápnik do okolia čo dvíha úroveň izolínie. Screenshot s pozorovania spomínaného javu je zobrazený v prílohe č. 9 a časť priebehu kde je možné pozorovať tento nárast na obr.8.3.

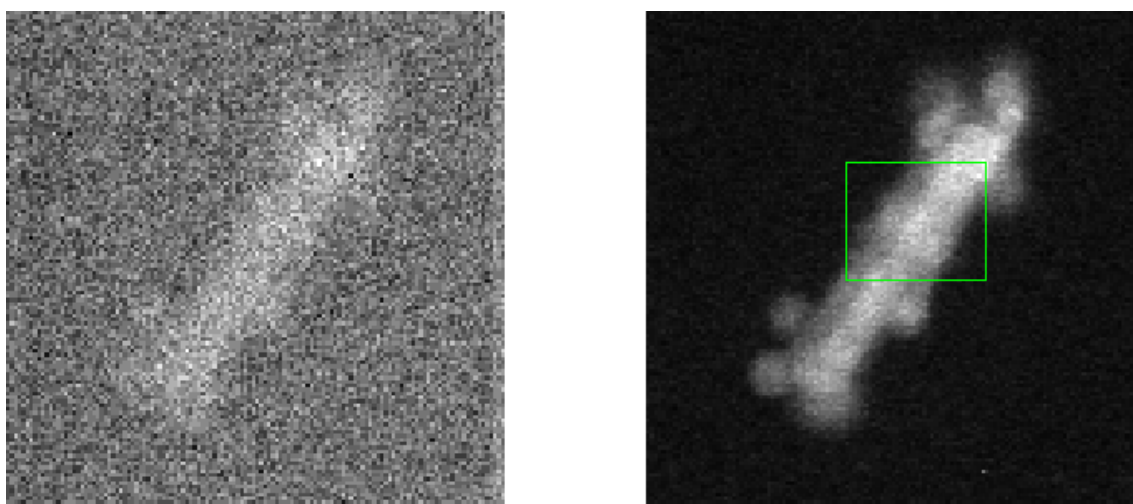


Obr. 8.3: Posun izolínie

Offline experimentmi boli tiež zistené nedostatky, o ktorých pojednáva nasledujúca kapitola 8.6.3. Jedným s týchto nedostatkov je vidieť aj na obr. 8.3 kde došlo k chybovej detekcii peaku pri zmene rozsahu signálu.

8.6.2 Experimenty so živými bunkami

Pri snímaní buniek kardiomyocytu kamerou boli získané obrazové dáta vo veľmi dobrej kvalite, čo sa týka šumu v obraze. Dobrá kvalita obrazových dát bola výsledkom EMCCD zosilnenia na čipe detektoru. Zosilnenie bolo volené prevažne okolo hodnoty 150 tiež v závislosti na čase expozície. Ten sa pohyboval prevažne okolo 10 ms pre zachovanie dostatočného časového rozlíšenia. Bol vykonaný test rozdielu medzi dvoma akvizíciami, ktorého výsledky je možno zhodnotiť s obr. 8.4. Jedna akvizícia bola uskutočnená bez zosilnenia a druhá so zosilnením 150

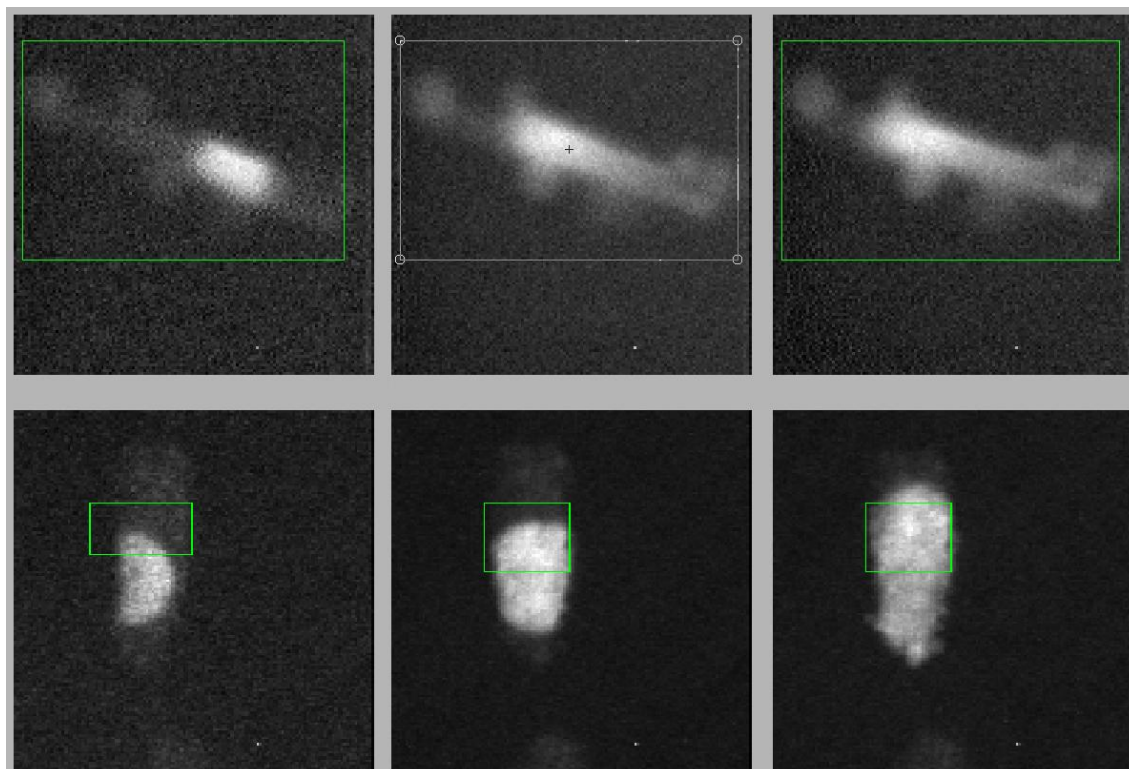


Obr. 8.4: Porovnanie snímok so zosilnením (vpravo) a bez (vľavo)

V ďalšom kroku experimentu bola meraná dynamika koncentrácie intracelulárneho vápnika. Pri skúmaných vzoriek buniek však neboli spozorované vápnikové transienty. Bunky vykazovali vápnikové vlny, ktorých sekvenčné zábery sú znázornené na obr. 8.5. Neúspešné boli tiež pokusy o získanie transientov pridaním vápnika do roztoku s bunkami, ako aj pokusy s elektrostimuláciou buniek. Je možné, že generátor impulzov bol poškodený a neplnil funkciu podľa očakávaní..

Meranie prebehlo aj na bunkách, ktoré vykazovali vápnikové vlny. Pri týchto meraniach však nebola braná intenzita žiarenia v celej bunke, ale iba v jej úzkej časti, ktorou vlna prechádzala. V tejto časti bunky bolo vykonané meranie, ktorým sa zistila amplitúda oscilácie a frekvencia opakovania oscilácií. Interval medzi jednotlivými

vápníkovými vlnami v bunke boli rôzne pre každú bunku. Namerané hodnoty boli v rozmedzí od 2,8 s – 17,5 s.



Obr. 8.5: Sekvencie záznamu vápníkových vln

Priebeh jedného z meraní, k nahliadnutiu v prílohách č. 6 a 7, prebiehal vyhľadáváním bunky, ktorá vykazovala vápníkové vlny. Vzhľadom na slabú intenzitu v obraze bola zvolená expozičná doba 20 ms a zosilnenie 156. V obraze bol vyznačený ROI ako úzky pás, približne v strede bunky, ktorým prechádza vápníková vlna. Boli nastavené parametre filtru na hodnoty, ktoré boli zistené v offline experimentoch. Vzhľadom na dlhý interval medzi vápníkovými vlnami v bunke bola zvolená šírka okna detekcie amplitúdy na 20 s. Následne bola spustená analýza obrazu. Boli resetované grafy filtrovaného signálu a frekvencie oscilácií z dôvodu chybnnej detekcie na začiatku analýzy obrazu, ktorá je vysvetlená v kapitole 8.6.3. Pri prechode vlny cez ROI sa na grafoch intenzity a filtrovaného signálu zobrazil náhly nárast a pokles hodnôt. Po prechode druhej vlny cez ROI a detekcií druhého peaku vo filtrovanom signály bol do grafu frekvencie oscilácií zakreslený prvý bod na hodnote 0,084 Hz (približne 12 s). Po prechode ďalšej vlny bola vykreslená do grafu ďalšia hodnota frekvencie zistená z časového intervalu medzi poslednými dvoma peakmi. Táto frekvencia mala nižšiu hodnotu. Pri pokračovaní bola zistená ešte jedna hodnota 0,058 Hz (približne 17 s). Vzhľadom na dlhé intervaly medzi osciláciami bola prerušená analýza a vyhľadaná iná bunka s väčšou frekvenciou oscilácií.

Ďalšia vyhl'adaná bunka prejavovala častejšie vápnikové vlny. Obrázok bol však viac zaťažený šumom, preto bola prerušená akvizícia zmenená šírka okna detekcie amplitúdy na hodnotu 5 s, zvýšené zosilnenie na hodnotu 203 a následne opätovne spustená akvizícia. Zvyšné nastavenia pre analýzu dát ostali nezmenené. Získaný obrázok bol v oveľa menšej miere zaťažený šumom. Bol vyznačený ROI opäť v centrálnej časti bunky a spustená analýza obrazu. Na grafickom priebehu bolo pozorované mierne kolísanie frekvencie oscilácií okolo hodnoty frekvencie 0,275 Hz (približne 3,6 s). Záznam merania je k dispozícii v prílohe č. 8. Meranie bolo ukončené z dôvodu uhynutia bunky.

8.6.3 Diskusia nad systémom

Realizovaný systém splnil čo bolo očakávané. Pre meranie koncentrácie intracelulárneho vápnika v reálnom čase nebolo potrebné vysoké priestorové rozlíšenie ale vysoké časové rozlíšenie, ktoré dosahuje vzhľadom na dostupné technológie fluorescenčný mikroskop. Ten dopĺňala vysoko rýchlostná kamera Ixon3 860, ktorá dokázala zaznamenávať obrazové dáta v požadovanej rýchlosťou okolo 200 snímokov/s. Vybraný typ fluorescenčného indikátora Fluo-4 AM poskytoval vzhľadom na jeho emisné a excitačné spektrum rýchlu a výraznú zmenu intenzity po naviazaní na vápnik. Detekciu tohto žiarenia výrazne zlepšila technológia EMCCD čipu kamery, ktorý disponuje takou citlivosťou že dokáže detegovať každý fotón emitovaný pozorovaným vzorkom, čo s kamerového systému robí ideálny nástroj pre snímanie slabých fluorescenčných signálov pri rýchlych dejoch. Toto potvrdili aj výsledky meraní, ktoré boli vo veľmi malej miere zaťažené šumom. Vytvorený program s užívateľským prostredím komunikuje s kamerovým systémom bez problémov a umožňuje užívateľovi možnosti nastavenia parametrov akvizície a parametrov spracovania meraných údajov.

8.6.4 Nedostatky programu pre analýzu

Pri vykonávaní experimentov boli zistené určité nedostatky, ktoré boli spôsobené najmä analýzou v reálnom čase.

Pri spustení analýzy je detegovaných viacero peakov vo vyfiltrovanom signály, a tým vypočítaná vysoká frekvencia oscilácií. Táto chybná detekcia je spôsobená tým, že zatiaľ nedošlo k správne nastaveniu prahovej hodnoty pre detekciu peakov, pretože funkciou, ktorá túto prahovú hodnotu nastavuje, neprešlo dostatočný počet vzoriek v dostatočnom rozsahu. Z toho istého dôvodu, nedostatočného rozsahu vzoriek, nastáva chybná detekcia peakov a nesprávny výpočet frekvencie, pokiaľ sa predchádzajúci peak prestane nachádzať vo vzorkovacom okne funkcie, ako môžeme vidieť na konci priebehu v prílohy č. 9 a v priebehu č. 10. Tento nedostatok sa

vyskytuje aj v prípade funkčného bloku, ktorý meria amplitúdu oscilácií. Nemožno ho však odstrániť adaptabilným vzorkovacím oknom z dôvodu, že funkcie typu *Point by point*, používané pre analýzu v reálnom čase pri zmene vstupného parametra dĺžky vzorkovacieho okna, neuchovávajú doposiaľ získané vzorky signálu.

Ďalším nedostatkom je, že kamerový systém, ako už bolo spomínané v kapitole 7.2, nie je schopný pri danom nastavení módu akvizície a zároveň pri veľmi krátkych expozičných časoch odosielať na výstup kamerového systému každé zosnímané dáta.

Videozáznam nahrávaný v priebehu merania obsahuje snímky z celkového obrazu získavaného kamerovým systémom. Dáta z kamerového systému sú reprezentované 16-bitovým dátovým typom, zatiaľ čo záznam je ukladán ako dáta v 8-bitovom. 16-bitové dáta sú konvertované funkciou pre zmenu dátového typu obrazu, avšak výsledný záznam nezodpovedá nasnímanej scéne.

9 ZÁVER

Cieľom tejto diplomovej práce bolo zoznámenie sa s fluorescenčnou a konfokálnou mikroskopiou, s princípom fluorescence, fluorescenčnými metódami a farbivami pre meranie koncentrácie intracelulárneho vápnika v bunkách.

Ďalším bodom bol výber vhodnej metódy merania koncentrácie intracelulárneho vápnika u živočíšnych buniek. Následne bol navrhnutý postup merania dynamiky vápnika excitabilnej bunky, konkrétne kardiomyocytu, s pomocou vhodného fluorescenčného farbiva. Vzhľadom na meranie pomerne rýchlych dejov v reálnom čase bol zvolený postup merania pomocou fluorescenčného mikroskopu, vysokorýchlostnej kamery a fluorescenčného farbiva Fluo-4.

Ďalším bodom bol návrh systému pre RT akvizíciu, spracovanie a vyhodnotenie fluorescenčných obrazov a realizácia tohto systému v programovacom prostredí LabVIEW. Realizovaný systém je užívateľsky prispôsobený pre výber ROI, snímania a vyhodnocovania obrazov a signálov s okamžitou odozvou. Realizácia časti programu pre vyhodnocovanie v reálnom čase bola vyvinutá a ladená na programe pre vyhodnocovanie obrazových dát z videozáznamu. Týmto programom boli vyhodnotené dostupné záznamy kardiomyocytu a kardiomyocytu s pridaním kofeínu a testovaná rôzna voľba parametrov pre funkcie vykonávajúce analýzu a vyhodnotenie obrazov a signálov. Bol vytvorený program s užívateľským rozhraním, ktorý zabezpečuje komunikáciu s kamerovým systémom, akvizíciu, analýzu a vyhodnotenie získaných obrazov a signálov.

Pre navrhnutý systém boli vykonané merania na živých bunkách kardiomyocytov, ktoré potvrdili správnu funkčnosť tohto systému. Systémom je možné merať a vyhodnocovať časový priebeh intenzity fluorescenčného žiarenia, teda dynamiky koncentrácie vápnika a získavať okrem hodnôt intenzity jej časové zmeny. Tieto zmeny reprezentujú oscilácie excitabilných buniek.

Vytvorený systém bol podrobne predstavený a popísaný aj s možnosťami jeho použitia a obmedzeniami, ktoré boli zistené a sú popísané v samostatnej kapitole.

10 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

[1] JIROUNEK, P. O šíření signálů v živých organizmech. *Vesmír* [online]. Jún 1996, 75, 334 [cit. 05.12.2013]. Dostupné z:
<<http://www.vesmir.cz/clanek/o-sireni-signalu-v-zivych-organizmech-%285%29>>
ISSN 1214-4029

[2] ŠIMURDA, J. *Bioelektrické jevy*. Brno, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, VUT Brno. 2007. p. 1 - 72.

[3] LEHOTSKÝ, J. Vápník v bunke. *Vesmír* [online]. September 1997, 76, 508 [cit. 05.12.2013]. Dostupné z:
<<http://www.vesmir.cz/clanek/vapnik-v-bunke>>. ISSN 1214-4029

[4] KRINKE, O. et al. Metody měření koncentrace Ca²⁺ iontů použitelné při studiu buněčné signalizace. *Chemické listy* [online]. Apríl 2005, 99, 4 [cit. 22.11.2013]. Dostupné z:
<http://chemickelisty.cz/common/content-issue_4-volume_99-year_2005.html>. ISSN 1213-7103

[5] TAKAHASHI, A. et al. Measurement of Intracellular Calcium. *The American Physiological Society* [online]. © 2013 Január 1999, 79, 4, [cit. 24.11.2013]. Dostupné z:
<<http://physrev.physiology.org/content/79/4/1089.long#sec-2>>. ISSN 1089-1125

[6] ABRAMOWITZ, M. et al. Introduction to Fluorescence. *Olympus America Inc.* [online]. © 2012 [cit. 22.11.2013]. Dostupné z:
<<http://www.olympusmicro.com/primer/lightandcolor/fluorointroduction.html>>

[7] ABRAMOWITZ, M. et al. Anatomy of Fluorescence Microscope. *Olympus America Inc.* [online]. © 2012 [cit. 06.12.2013]. Dostupné z:
<<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/anatomy/fluoromicroanatomy.html>>

[8] ABRAMOWITZ, M. et al. Fluorescence Filters. *Olympus America Inc.* [online]. © 2012 [cit. 06.12.2013]. Dostupné z:
<<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/filters.html>>

- [9] Fluorescence Fundamentals. *Thermo Fisher Scientific* [online]. © 2013 [cit. 22.11.2013]. Dostupné z:
<<http://www.lifetechnologies.com/sk/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/introduction-to-fluorescence-techniques.html>>
- [10] Měření vnitrobuněčné koncentrace volných vápenatých iontů. *Kolektiv oddělení Buněčné neurofyzologie Fyziologického Ústavu AVČR* [online]. [cit. 24.11.2013]. Dostupné z:
<<http://www2.biomed.cas.cz/d331/vade/vapnik.html>>
- [11] Fluorescencia. *Univerzita Komenského* [online]. [cit. 22.11.2013]. Dostupné z:
<http://www.ddp.fmph.uniba.sk/~hola/index_file/fluor/fluor3.html>
- [12] Indo-1 Calcium Indicator. *Thermo Fisher Scientific* [online]. © 2013 [cit. 24.11.2013]. Dostupné z:
< <http://www.lifetechnologies.com/sk/en/home/life-science/drug-discovery/target-and-lead-identification-and-validation/g-protein-coupled-html/cell-based-second-messenger-assays/indo-1-calcium-indicator.html>>
- [13] Fluo-3 Calcium Indicator. *Thermo Fisher Scientific* [online]. © 2013 [cit. 24.11.2013]. Dostupné z:
< <http://www.lifetechnologies.com/sk/en/home/life-science/drug-discovery/target-and-lead-identification-and-validation/g-protein-coupled-html/cell-based-second-messenger-assays/fluo-3-calcium-indicator.html>>
- [14] Fura-2 Calcium Indicator. *Thermo Fisher Scientific* [online]. © 2013 [cit. 24.11.2013]. Dostupné z:
< <http://www.lifetechnologies.com/sk/en/home/life-science/drug-discovery/target-and-lead-identification-and-validation/g-protein-coupled-html/cell-based-second-messenger-assays/fura-2-calcium-indicator.html>>
- [15] Fluorescent Ca²⁺ Indicators Excited with Visible Light-Section. *Thermo Fisher Scientific* [online]. © 2013 [cit. 24.11.2013]. Dostupné z:
<<http://www.lifetechnologies.com/sk/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/indicators-for-ca2-mg2-zn2-and-other-metal-ions/fluorescent-ca2-indicators-excited-with-visible-light.html#head2>>

- [16] Anisotropic diffusion of fluorescently labeled ATP in rat cardiomyocytes determined by raster image correlation spectroscopy. *The American Physiological Society* [online]. © 2008 [cit. 24.11.2013]. Dostupné z: <<http://ajpcell.physiology.org/content/295/5/C1302>>. ISSN 1522-1563
- [17] FIŠAR Z. 1. Principy fluorescenční spektroskopie. *1. lékařská fakulta UK* [online]. [cit. 24.11.2013]. Dostupné z: <<http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/principy.html>>
- [18] ANDOR Ixon3 860 Specification. *Andor Technology* [online]. © 2007 [cit. 02.01.2014]. Dostupné z: <http://www.andor.com/pdfs/specifications/Andor_iXon_860_Specifications.pdf>
- [19] What Is EMCCD Technology. *Andor Technology* [online]. © 2007 [cit. 02.01.2014]. Dostupné z: <http://www.emccd.com/what_is_emccd/>
- [20] Fluorescence Imaging Filters and Sets. *Thorlabs, Inc.* [online]. © 1999-2014 [cit. 15.05.2014]. Dostupné z: <<http://www.thorlabs.de/catalogpages/V21/1718.PDF>>

ZOZNAM SKRATIEK

Skratka	Význam
AM	Acetoxymethylestér
ATP	Kyselina Adenozintrifosforečná
CCD	Nábojovo-viazaná štruktúra
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EMCC	Elektrónovo násobená nábojovo viazaná štruktúra
Em	Emisia
Ex	Excitácia
FIR	Konečná impulzná charakteristika
IIR	Nekonečná impulzná charakteristika
RNA	Ribonukleová kyselina
ROI	Oblasť záujmu
RT	Reálny čas
TTL	Tranzistor- tranzistor logika
UV	Ultrafialové žiarenie

ZOZNAM PRÍLOH

Príloha č. 1- Ukážka užívateľského rozhrania programu pre akvizíciu spracovania a vyhodnotenie v reálnom čase

Príloha č. 2- Blokový diagram programu pre akvizíciu spracovania a vyhodnotenie v reálnom čase (1. časť)

Príloha č. 3- Blokový diagram programu pre akvizíciu spracovania a vyhodnotenie v reálnom čase (2. časť)

Príloha č. 4- Ukážka užívateľského rozhrania programu pre spracovanie a vyhodnotenie videozáznamu

Príloha č. 5- Blokový diagram programu pre spracovanie a vyhodnotenie videozáznamu

Príloha č. 6- Ukážka priebehu merania č. 1 v RT (1. časť)

Príloha č. 7- Ukážka priebehu merania č. 1 v RT (2. časť)

Príloha č. 8- Ukážka priebehu merania v RT č. 2

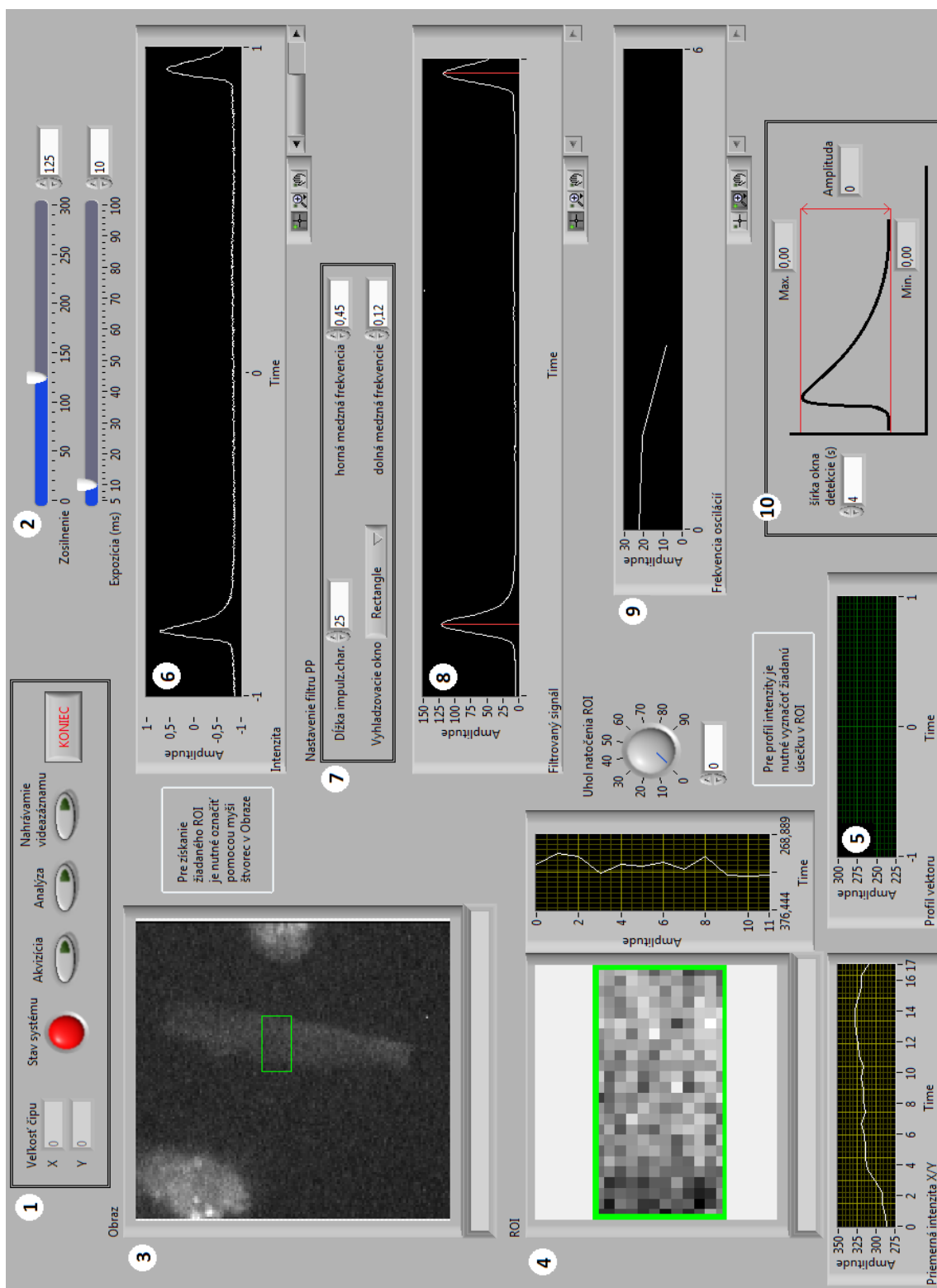
Príloha č. 9- Ukážka priebehu merania z videozáznamu „kardiomyocyt + kofeín“ v určitom časovom úseku

Príloha č. 10- Ukážka priebehu merania z videozáznamu „kardiomyocyt + kofeín“

Príloha č. 11- CD s elektronickou verziou práce, zdrojovými kódmi programov a videozáznamami

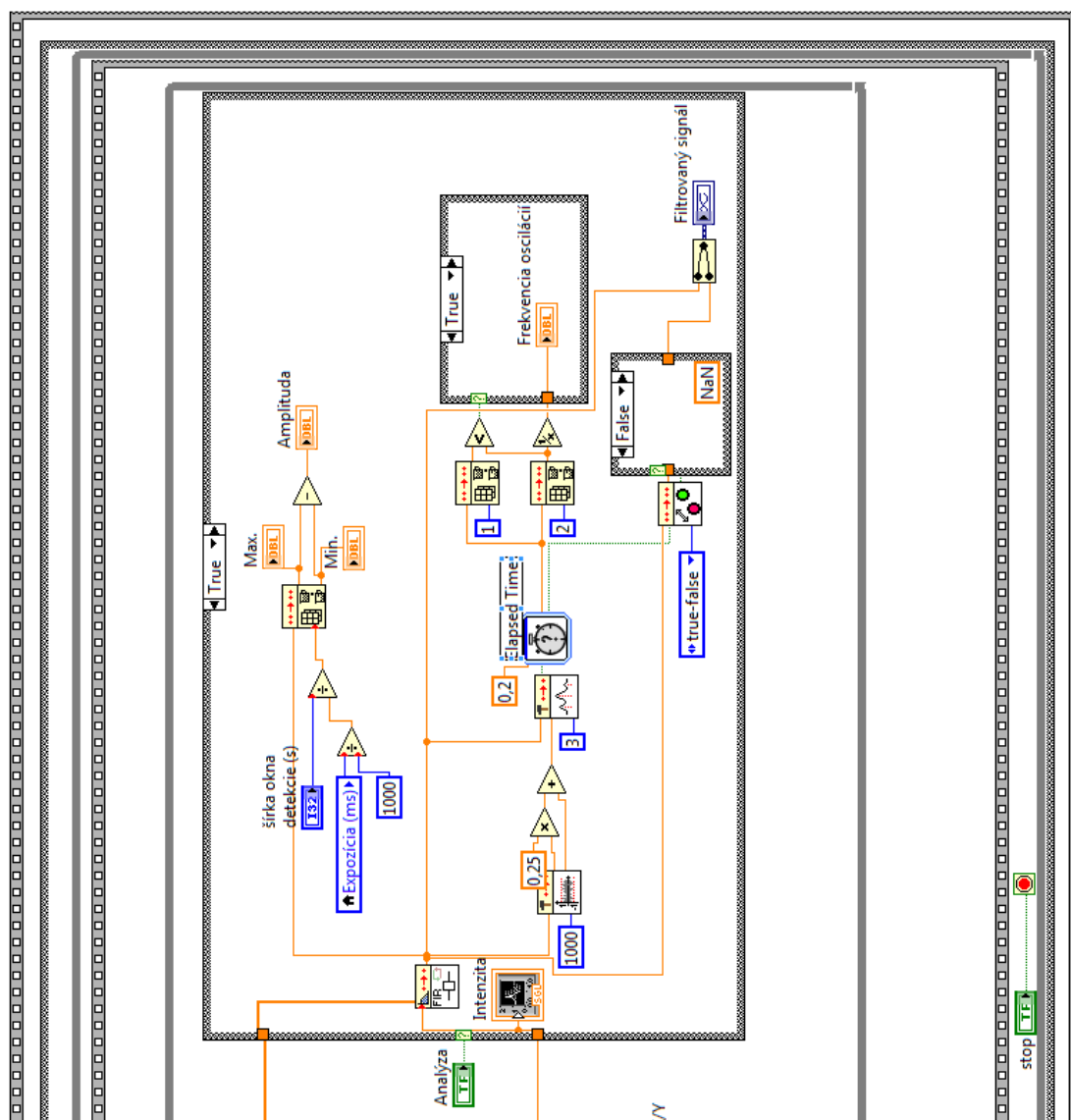
PRÍLOHY

Príloha č. 1 – Ukážka užívateľského rozhrania programu pre akvizíciu spracovania a vyhodnotenie v reálnom čase

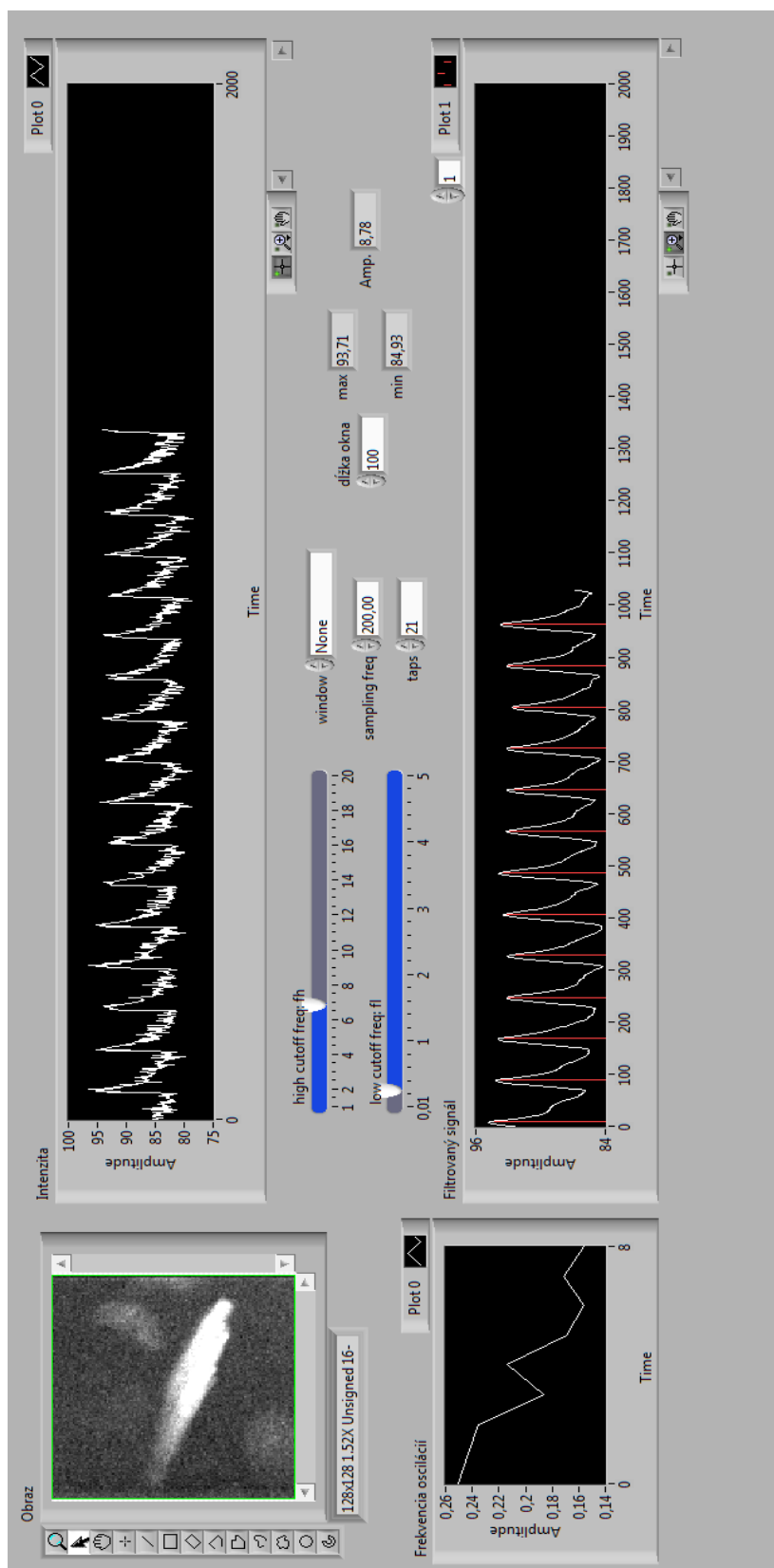


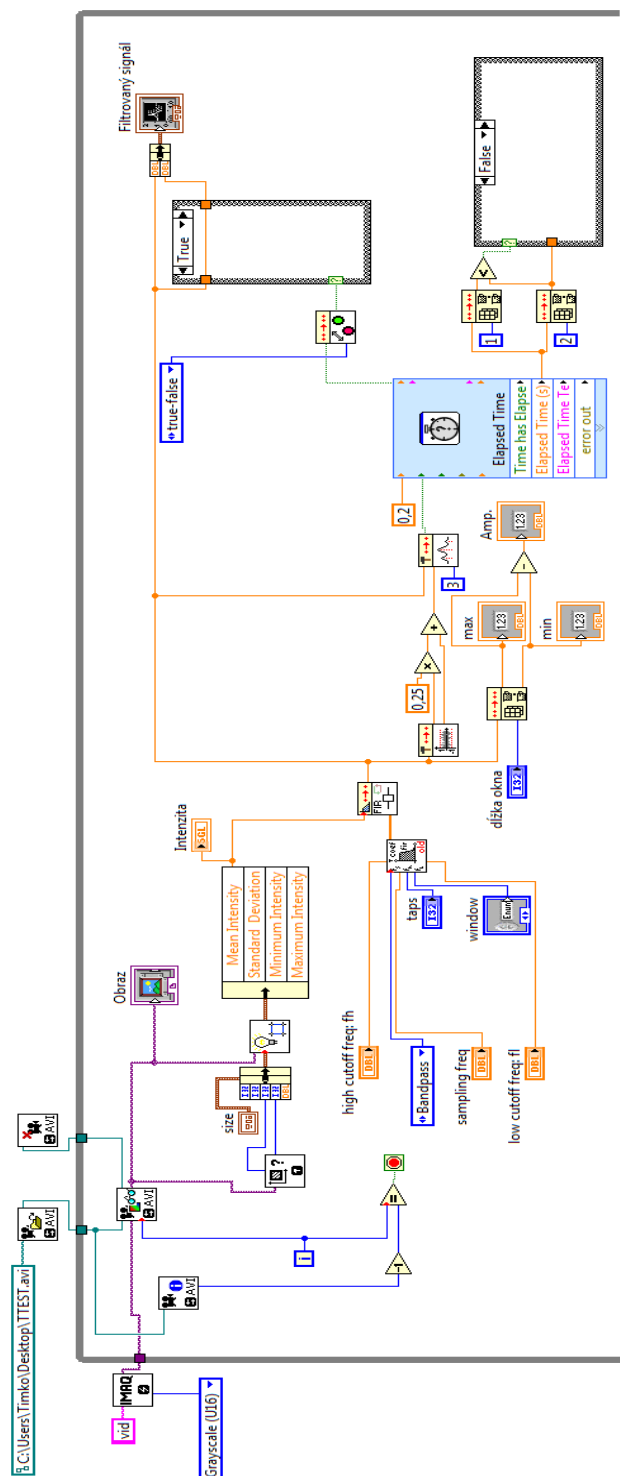
[illegible]

Príloha č. 3 – Blokový diagram programu pre akvizíciu spracovania a vyhodnotenie v reálnom čase (2. časť)

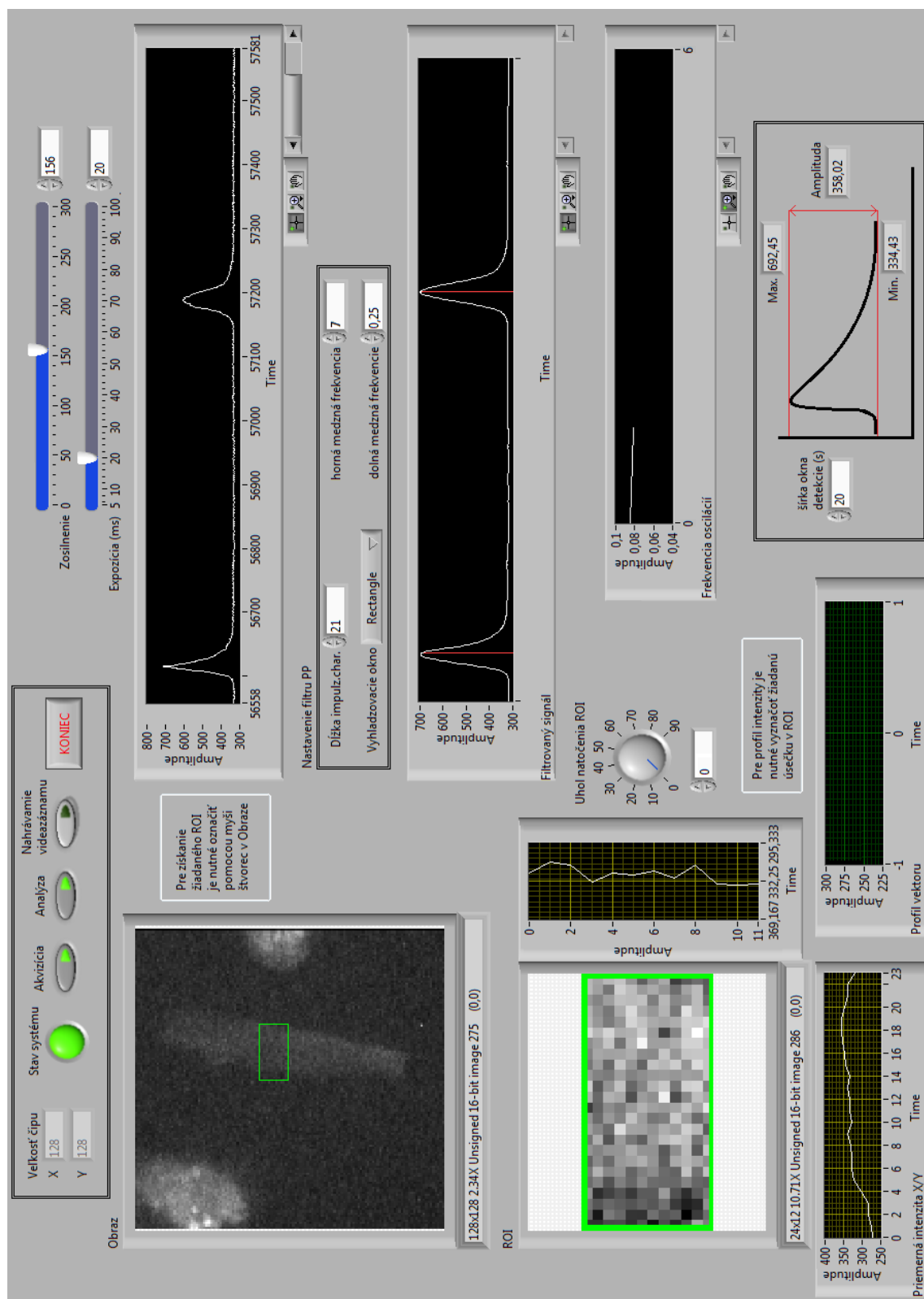


Príloha č. 4 – Ukážka užívateľského rozhrania programu pre spracovanie a vyhodnotenie videozáznamu

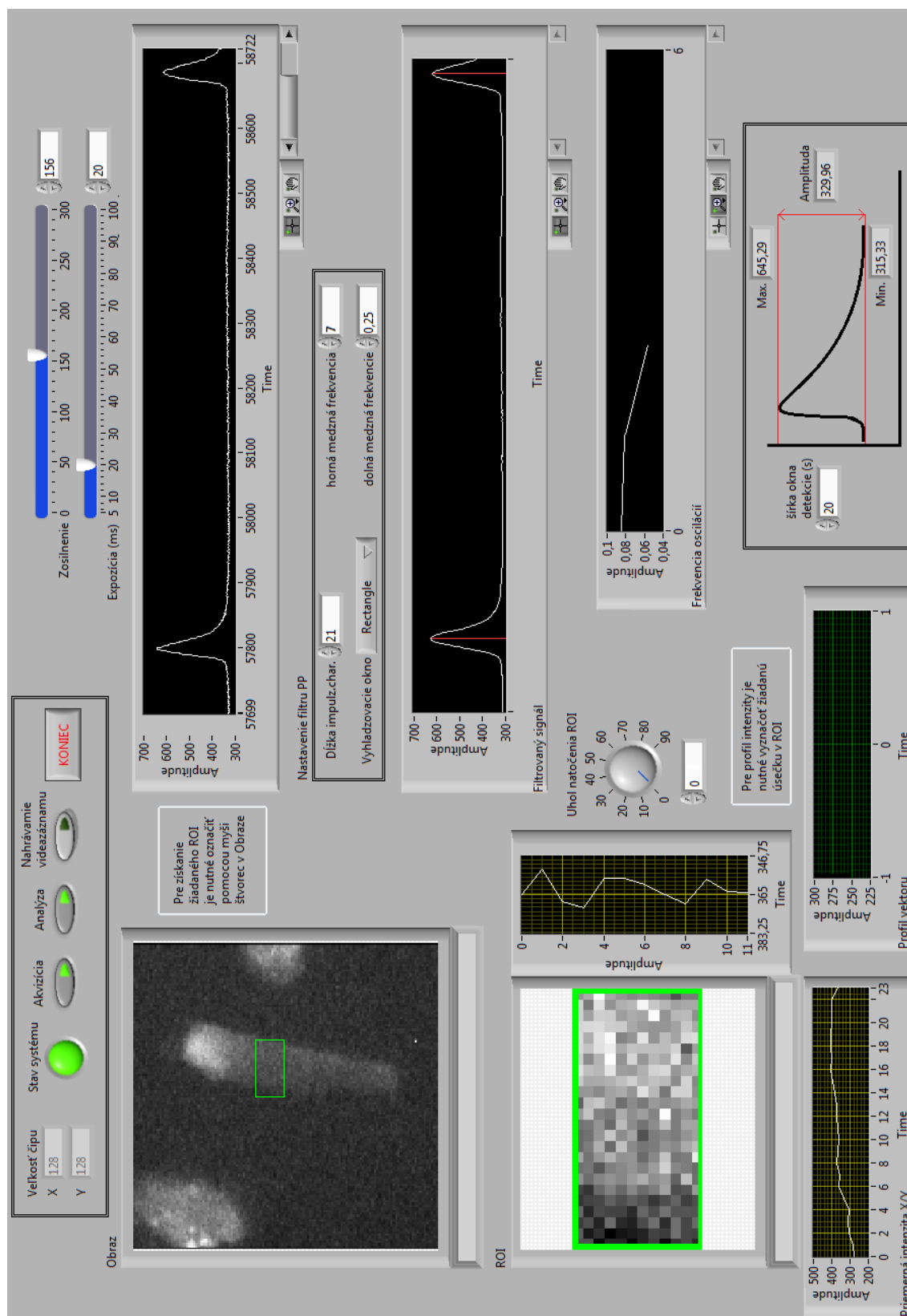




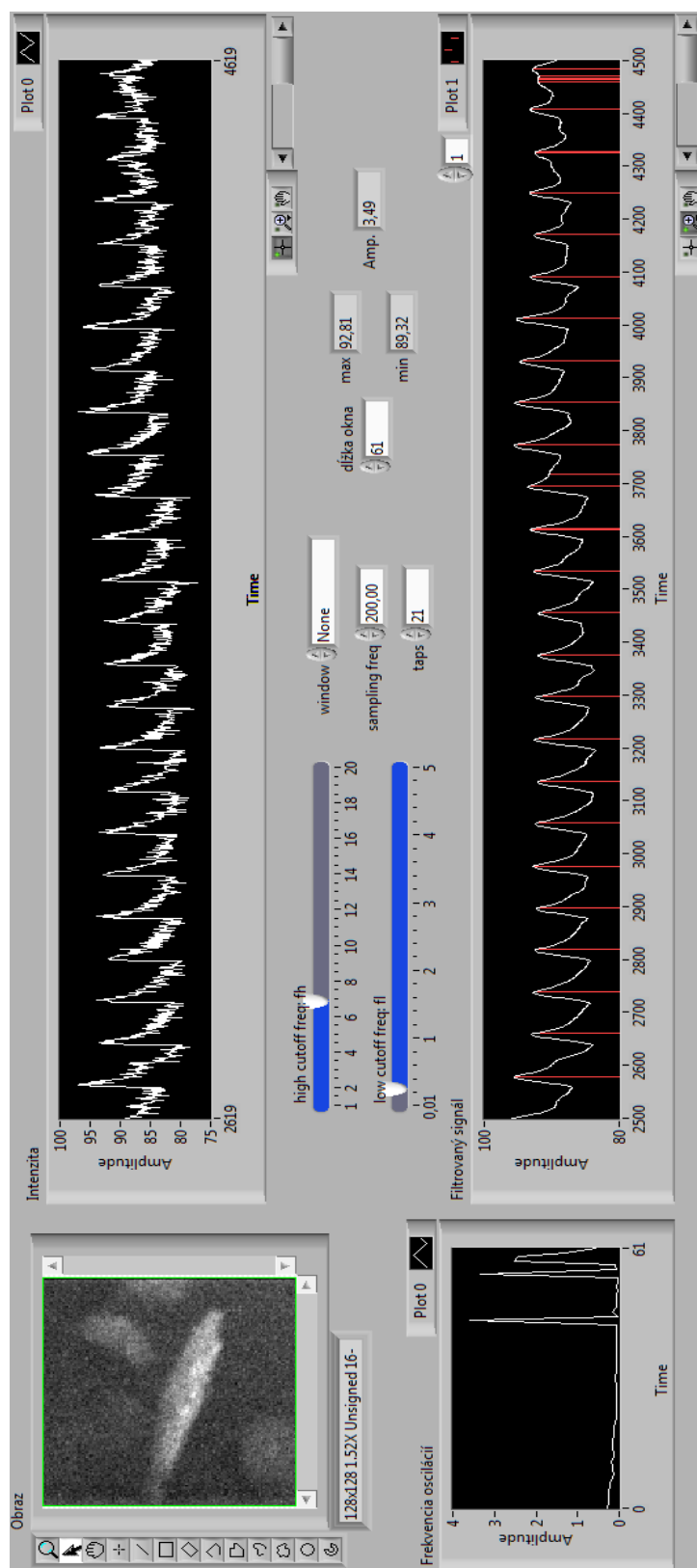
Príloha č. 6 – Ukážka priebehu merania č. 1 v RT (1. časť)



Príloha č. 7 – Ukážka priebehu merania č. 1 v RT (2. časť)



Príloha č. 9 – Ukážka priebehu merania z videozáznamu „kardiomyocyt + kofeín“
v určitom časovom úseku



Príloha č. 10 – Ukážka priebehu merania z videozáznamu „kardiomyocyt + kofeín“

